FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N° 6

Sur le Microdosage colorimétrique de la Protidorachie et de la Protidémie

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

par

Jean-Marie CARRET

né le 8 Juin 1930 à Avignon

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse

MM. Professeur C. DUMAZERT, Président
Professeur J. DELPHAUT
Agrégé M. MOURGUE
Agrégé C. GREBUS

assesseurs

AVIGNON
IMPRIMERIE RULLIERE

1955

FACULTÉ MIXTE
DE
MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE
DE MARSEILLE

N°

Sur le Microdosage colorimétrique de la Protidorachie et de la Protidémie

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine Générale et Coloniale et de Pharmacie de Marseille

par

Jean-Marie CARRET

né le 8 Juin 1930 à Avignon

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse : MM. Professeur C. DUMAZERT, Président ; Professeur J. DELPHAUT ; Agrégé M. MOURGUE ; Agrégé C. GREBUS — assesseurs

AVIGNON
IMPRIMERIE RULLIERE

1955

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE GÉNÉRALE ET COLONIALE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

Doyen : G. MORIN — Assesseur : J. DELPHAUT

Doyen honoraire : L. IMBERT

Professeurs honoraires : MM. AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, HECKENROTH, JOYEUX, OLMER, RIMATTEI, ROCHE, ROGER, MONGES.

Chargé de cours honoraire : M. TIAN.

Secrétaire Principal : J. COMTE. — Bibliothécaire : Mlle PERRIN

PROFESSEURS

Anatomie	GRISOLI
Anatomie pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie générale	BRAHIC
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie clinique et expérimentale	JOUVE
Chimie médicale	DERRIEN
Chimie analytique et Hydrologie	ARNOUX
Chimie	DUMAZERT
Clinique chirurgicale	FIOLLE
Clinique chirurgicale	MOIROUD
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie	SALMON
Clinique chirurgicale thérapeutique et Chirurgie expérimentale	DE VERNEJOUL
Clinique dermato-syphiligraphique	CHARPY
Clinique exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système nerveux	POURSINES
Clinique médicale	MATTEI
Clinique médicale	POINSO
Clinique médicale thérapeutique	OLMER J.
Clinique des Maladies des Voies digestives et de la Nutrition	RECORDIER
Clinique médicale infantile	GIRAUD
Clinique neuro-chirurgicale	PAILLAS
Clinique obstétricale et gynécologique	CHOSSON
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique urologique	CHAUVIN
Histologie	PICARD
Hygiène et Médecine préventive	SAUTET
Matière médicale	BALANSARD
Médecine légale et Médecine du travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie chirurgicale	CARCASSONNE
Pathologie interne	AUDIER
Pharmacologie	MERCIER
Pharmacie chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physique médicale	DUBOULOZ
Thérapeutique	PIERI
Professeur sans chaire	ROUX

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

MM. BOURRET
DONNET
GREBUS
MERCIER Jacques
MOURGUE
LISSITSKY

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. APPAIX
BERNARD
CREMIEUX
GRANJON
HENRY
LAMY
LAVAL
LENA
MARONNEAUD
MONGES H.
OLLIVIER
OURGAUD
PAOLI
RAYBAUD
SERMENT
VAGUE

AGRÉGÉS LIBRES

MM. BERTHIER
DOR
FIGARELLA
M. IMBERT

Chargés des fonctions de Maîtres de Conférences

Anatomie pathologique ..... M. PAYAN
Botanique et Cryptogamie ..... M. BERNARD P.
Histologie ..... M. STAHL

Chargé des fonctions d'Agrégé

Clinique urologique ..... M. CHAUVIN

A MON PÈRE,

A MA MÈRE,

A MA SŒUR,

AUX MIENS.

A mon Maître, Monsieur le Professeur C. DUMAZERT,

Qui m'a guidé tout au long des années passées au Laboratoire. Grâce à ses conseils éclairés, j'ai pu mener à bien ce travail. Qu'il veuille trouver ici un modeste témoignage de l'expression de ma profonde gratitude et de ma respectueuse admiration.

A Monsieur le Professeur J. DELPHAUT

Assesseur du doyen,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui m'a fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail ; je l'en remercie très respectueusement.

A Monsieur le Professeur agrégé M. MOURGUE

Qui a bien voulu faire partie de mon Jury de thèse ; qu'il soit assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur agrégé C. GREBUS,

Qui s'est intéressé à mes recherches. Je tiens à le remercier de l'extrême obligeance dont il a fait preuve à mon égard en maintes circonstances ; qu'il veuille croire en ma sincère et respectueuse reconnaissance.

A mes Maîtres de la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Marseille

A mes Camarades du Laboratoire de Chimie
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Marseille,
et en particulier à :

Monsieur C. GHIGLIONE,
Docteur d'Etat en Pharmacie,
Licencié ès sciences

Madame M. BOZZI-TICHADOU,
Docteur en Pharmacie

en remerciement de leurs conseils.

INTRODUCTION

I. – COLORIMÉTRIE.

On utilise de plus en plus fréquemment en biologie pour des déterminations quantitatives, la coloration propre de certaines substances ou de certains de leurs dérivés. Les méthodes colorimétriques se prêtent bien aux dosages en série sur des prises d'essai restreintes ; toutefois, elles ont souvent été critiquées quant à la précision des résultats qu'elles fournissent. Il apparaît cependant que si l'on a soin de préciser les meilleures conditions d'emploi de ces techniques, il est souvent possible d'égaler la précision des autres méthodes analytiques.

A l'origine, on utilisa surtout la colorimétrie en lumière blanche ; dans ce cas, on apprécie l'intensité de la coloration d'une solution de concentration inconnue, par rapport à une solution de titre connu de la même substance. Mais si cette méthode est très simple, elle nécessite des intensités de coloration assez importantes et l'emploi constant d'un étalon. De plus la précision est rarement supérieure à 5 %.

Actuellement, à côté de la colorimétrie en lumière blanche se développent de plus en plus des méthodes utilisant l'absorption de radiations sélectionnées aussi monochromatiques que possible ; on évalue alors, non plus les couleurs, mais le rapport de l'intensité lumineuse transmise après la traversée de la solution, à l'intensité lumineuse incidente. Ces techniques beaucoup plus sensibles et précises que les précédentes font toutefois naître des causes d'erreurs importantes dont il est indispensable d'être averti.

Si au lieu d'éclairer une solution colorée par de la lumière blanche, on utilise une lumière monochromatique, ou tout au moins sélectionnée, la coloration du faisceau transmis ne sera pas différente de celle du faisceau incident ; il n'y aura entre eux qu'une différence d'intensité lumineuse. Un dispositif convenable permettra d'évaluer le rapport des intensités de ces deux faisceaux, ce qui réalise un grand progrès sur la colorimétrie en lumière blanche. On obtiendra

ainsi un accroissement de la sensibilité et de la précision, la suppression de l'étalon qui ne sera plus indispensable à chaque mesure, un étalonnage de l'appareil pouvant être fait une fois pour toutes.

Pour que la loi de Beer-Lambert s'applique d'une façon stricte, il est nécessaire d'utiliser une radiation monochromatique correspondant à une forte absorption par la substance à doser, et non pas une bande du spectre.

On devra, de plus, éviter la présence d'un trouble dans la solution à doser, car celui-ci provoquerait une perte de lumière par diffusion ; or, comme l'intensité perdue est comptée comme absorbée par la solution, il en résulterait une erreur par excès nullement négligeable, même pour des solutions d'aspect limpide. A. DOGNON [14] a d'ailleurs particulièrement souligné l'importance de ces erreurs et indiqué des méthodes permettant de mettre un trouble en évidence et de s'en affranchir.

En résumé la colorimétrie en lumière sélectionnée a permis d'accroître considérablement la sensibilité et la précision des dosages biologiques, mais elle a fait naître une série de difficultés dont il est nécessaire d'être averti pour éviter des erreurs parfois grossières.

En ce qui concerne le dosage des protéines, un certain nombre de méthodes colorimétriques n'ont pas manqué d'être proposées en raison des avantages signalés ci-dessus. On trouvera plus loin la description de ces méthodes basées sur les principales réactions colorées caractéristiques des protéines.

L'étude de la valeur de telles techniques comporte nécessairement la comparaison des résultats qu'elles sont susceptibles de donner avec ceux obtenus avec une méthode de référence. Ceci nous amène à exposer ici très rapidement quelles sont les principales méthodes de dosage de l'azote protéique afin de justifier le choix de la méthode de référence que nous utiliserons.

II. – CHOIX D'UNE MÉTHODE DE RÉFÉRENCE POUR LE DOSAGE DE L'AZOTE PROTÉIQUE.

A) Méthode de Kjeldahl.

Parmi les méthodes exactes et sûres qui permettent de doser de faibles quantités d'azote protéique, la meilleure nous paraît être le microkjeldahl ; le dosage se fait en deux temps.

1. — *Minéralisation sulfurique des corps organiques.*

Le principe en est le suivant : en présence d'acide sulfurique concentré, à l'ébullition, les corps organiques sont décomposés,

l'azote des fonctions aminées, amidées, et celui contenu dans certains noyaux hétérocycliques, est quantitativement transformé en ammoniac. C'est sous cette forme qu'il sera ultérieurement dosé. La minéralisation est favorisée par la présence de divers sels métalliques agissant les uns comme catalyseurs (sels de cuivre, de mercure), les autres (sulfate de potassium) en élevant le point d'ébullition de l'acide sulfurique. Nous emploierons pour notre part le mélange minéralisateur de C. DUMAZERT et Y. MARCELET [19] contenant 1 gr. de sélénite mercurique et 24 gr. de sulfate de potassium pur.

Mode opératoire : on introduit la prise d'essai qui doit contenir environ 1 mg d'azote dans un matras à Kjeldahl. On ajoute 1 à 2 ml d'acide sulfurique concentré et une micromesure de mélange minéralisateur. On chauffe à ébullition à feu très doux, sous une hotte jusqu'à production de fumées blanches. A ce moment-là l'évaporation de l'eau est achevée. On coiffe le matras d'un petit entonnoir, pour éviter l'évaporatoin de l'acide sulfurique, et on continue à chauffer à l'ébullition. Le milieu brunit, puis devient incolore au bout d'un certain temps. La destruction de la matière organique n'est pas nécessairement réalisée quand le milieu s'est décoloré ; aussi, convient-il de se baser sur l'expérience pour régler le temps de chauffe nécessaire à la transformation quantitative des divers corps azotés en ammoniac.

2. — *Dosage de l'ammoniac.*

La minéralisation terminée, on rince l'entonnoir, on laisse refroidir le matras et on introduit sans perte le liquide dans l'appareil de PARNAS et WAGNER. On rince le matras à 2 ou 3 reprises, en introduisant chaque fois les eaux de lavage dans l'appareil. On ajoute 10 ml de lessive de soude à 40 p. 100 ; on distille. On recueille environ 10 ml de distillat dans un erlen-Meyer contenant déjà 10 ml d'acide sulfurique N/70 coloré en rose par du rouge de méthyle. On titre l'excès d'acide par de la soude N/70 en suivant la technique préconisée par NICLOUX : après avoir porté à l'ébullition le liquide coloré en rose, on verse goutte à goutte de la soude N/70 jusqu'à coloration rose-saumon ; on porte de nouveau à ébullition pendant une minute, on refroidit complètement en passant l'erlen-Meyer sous un courant d'eau ; on termine le dosage à froid jusqu'à virage au jaune-serin. On fait un témoin.

Cette excellente méthode permet d'obtenir des résultats avec une erreur au plus égale à 1 p. 100.

D'autres techniques ont été proposées pour doser l'ammoniac après la minéralisation :

En 1933, Conway et Byrne [8] réalisent le submicrodosage de quantités d'ammoniac pouvant s'abaisser jusqu'à 0,014 mg à l'aide d'une technique consistant à déplacer à froid l'ammoniaque par le carbonate de potasse et à capter cette base volatile dans une solution titrée d'acide sulfurique. Cette opération, effectuée dans une minuscule enceinte close (unité) à deux compartiments concentriques et distincts, dure environ deux heures. L'excès d'acide est titré par une solution de soude en présence d'un indicateur constitué de rouge de méthyle et de bleu de méthylène. La précision obtenue est de 1 %.

Crismer [9], en 1937, prenant comme point de départ le travail de H. Borsook [5] propose le dosage photométrique de l'ammoniaque par un perfectionnement de la réaction de Berthelot : quand on met en contact de l'ammoniaque et du phénol en présence d'hypochlorite de sodium, il apparaît une coloration bleue ; l'auteur extrait l'ammoniaque par la technique de Conway et Byrne ; il remplace l'hypochlorite par une solution de chloramine T, corps bien cristallisé et ne contenant que très peu d'impuretés. Après un chauffage de 10 minutes au bain-marie il effectue la lecture au photomètre de Pulfrich à une longueur d'onde de 610 mμ et en cuve de 2 cm.

Cette technique donne des résultats satisfaisants : le pourcentage d'erreur est en général inférieur à 1 % et ne dépasse jamais 2 %.

En 1938, C. Dumazert [17] met au point une technique précise et simple s'adressant à des quantités d'ammoniac comprises entre 10 et 250 μg. Il emploie des petits matras à Kjeldahl dans lesquels il introduit la prise d'essai. Pour la distillation de l'ammoniaque, l'auteur utilise un appareil de Parnas et Wagner de dimensions réduites et muni d'une colonne à pointes de Vigreux entre le ballon à distiller et le réfrigérant qui, d'ordinaire, lui fait suite. Le distillat est reçu dans une fiole contenant un ou deux ml. d'acide sulfurique 0,01 N. On ajoute alors 50 mg environ d'iodure de potassium, et après dissolution, 2 ml grossièrement mesurés d'une solution d'iodate de potassium à 0,05 %. L'iode libéré, en quantité équivalente à celle d'acide sulfurique présent, est immédiatement titré par une solution d'hyposulfite de sodium 0,01 N préparée extemporanément. On fait de même pour le témoin. La détermination des quantités d'azote se fait avec une précision de 1 %.

En 1953 M. Herbain [29] adapte la réaction de Nessler au submicrodosage de l'azote : le liquide minéralisé est traité par le nitrate de baryum à pH et dilution déterminés afin d'éliminer la plus grande partie des ions sulfuriques et éventuellement phospho-

riques. Sur le liquide centrifugé, l'auteur pratique la Nesslerisation à température fixe avec un réactif en deux solutions :

a) une solution concentrée d'iodomercurate de sodium incorporée au liquide ammoniacal à doser ;

b) une solution d'hydroxyde de sodium exempte de carbonates, ajoutée au présent mélange sous agitation mécanique strictement réglée.

Il parvient ainsi à doser des quantités d'azote organique comprises entre 25 et 100 µg dans la prise d'essai. Mais l'erreur commise est assez considérable puisqu'elle atteint souvent plus ou moins 4 p. 100.

B) **Gravimétrie.**

Parallèlement à ces méthodes basées sur le procédé de Kjeldahl, nous pouvons citer la gravimétrie que beaucoup d'auteurs ont utilisée pour étalonner leurs techniques : la méthode classique repose sur le phénomène de la coagulation thermique qui constitue le caractère le plus spécifique des protéines. Les difficultés pratiques de cette méthode ont amené la création de méthodes pondérales qui utilisent non plus la coagulation thermique, mais la coagulation à froid par un liquide miscible.

Ainsi, la méthode de Kaiser [**35**] met en œuvre un mélange d'alcool et d'acétone. Celle de Delsal [**12**] emploie un mélange de méthanol et de méthylal. Mais les résultats étant systématiquement plus élevés que ceux obtenus par thermocoagulation classique, P. Fleury, J. Courtois et Mlle R. Eberhard [**23**] ont proposé une technique par thermocoagulation en milieu alcoolique qui conserve la rigueur de la méthode classique, tout en présentant les avantages de commodité et de rapidité des méthodes par précipitation à froid par un liquide miscible. On obtiendra la quantité d'azote protéique en divisant le résultat obtenu par un coefficient approprié à la protéine étudiée. Cette technique exige des prises d'essai plus importantes que le micro kjeldahl. De plus, si l'évaluation quantitative de la protéine se fait à 1 p. 100 près, l'emploi de coefficients de transformation de la protéine en azote peut créer des écarts plus importants. C'est pourquoi nous lui avons préféré le microkjeldahl.

C) **Méthode spectrophotométrique en lumière ultraviolette.**

A l'occasion de leurs travaux sur les courbes de relargage, Y. Derrien et ses collaborateurs [**13**] ont expérimenté pour le

dosage de l'azote protéique une méthode spectrophotométrique basée sur le fait que les aminoacides aromatiques contenus dans les protéines absorbent les radiations ultraviolettes du spectrophotomètre Beckman (modèle D.U.) à une longueur d'ondes de 275 mμ : la lecture est effectuée dans des cuves en silice de 1 cm contre un témoin d'eau distillée.

Les avantages et les inconvénients de la méthode spectrophotométrique comparés à ceux du dosage de l'azote protéique par le microkjeldahl sont discutés. Il semble cependant que si la spectrophotométrie est plus rapide et plus simple, le microkjeldahl convient mieux à une évaluation quantitative précise.

Avant d'élaborer l'étude critique des réactions colorées quantitatives et qualitatives, nous allons essayer de faire celle des techniques néphélémétriques, qui ont été fort employées par les biologistes depuis qu'à l'évaluation évidemment grossière à l'œil, a succédé la mesure véritable de l'intensité des troubles au moyen de photomètres visuels ou photoélectriques.

D) **Néphélémétrie.**

L'étude des propriétés optiques des milieux troubles soulève des problèmes intéressants au point de vue pratique et théorique. Les innombrables travaux qu'elle a suscités envisagent : soit la réduction d'intensité que subit un faisceau de radiations lumineuses traversant un milieu trouble, soit sa diffusion, soit enfin sa polarisation. Ce sont les deux premiers problèmes qui ont principalement intéressé les auteurs.

Avant d'aborder l'étude des techniques néphélémétriques il convient de mentionner la loi fondamentale qui régit la photométrie des milieux troubles :

Loi de Rayleigh : sans entrer dans le détail de l'équation qui l'exprime, on peut dire qu'elle définit la valeur de l'intensité du flux lumineux diffusé par des particules solides en suspension dans un milieu liquide par rapport : au flux lumineux incident, au nombre de particules non colorées, à la longueur d'onde de la lumière utilisée, et au volume total de la matière en suspension.

Dognon [15] en a donné une analyse très claire et très détaillée Cette loi implique un rapport de proportionnalité directe entre la concentration en particules suspendues et le flux diffusé, qui n'est valable que pour certaines dimensions des grains de diamètre inférieur à $\lambda/2\pi$ (λ étant la longueur d'ondes de la lumière utilisée), cessant de l'être pour les grains de dimensions supérieures.

C'est ainsi que le flux lumineux absorbé croît d'abord avec la grosseur des grains, passe par un maximum, puis diminue. Donc, si l'on veut pratiquer la néphélémétrie d'une manière valable, ou autrement dit, obtenir des courbes de floculations régulières, il faut :

1° s'assurer d'une taille donnée des grains dans la marge des grandeurs inférieures à la limite précédemment définie, et de la constance de cette taille pour toutes les concentrations à mesurer ;

2° que la concentration en particules suspendues ne soit pas trop forte, de manière à ce que les densités optiques restent au-dessous d'une certaine limite (90 ou 100 degrés Vernes).

La floculation présente deux phases : une première se caractérisant par une opacification croissante du milieu qui reste sensiblement homogène à l'œil, et une seconde au cours de laquelle la floculation proprement dite rend le milieu hétérogène et l'achemine progressivement vers une sédimentation plus ou moins rapide du floculat ; c'est évidemment, au cours de la première phase qu'il est légitime de placer la mesure photométrique et l'on a intérêt à rendre cette phase aussi longue que possible.

Les méthodes à l'acide trichloracétique (Mestrezat) aux acides phosphotungstique, métaphosphorique, tungstique, phosphotungstomolybdique devront donc être éliminées puisqu'elles provoquent une floculation trop prompte.

On ne peut donc retenir que les méthodes utilisant l'acide sulfosalicylique en solution aqueuse, telle que celle de Dos Reis [**16**] ou l'acide nitrique à 40 degrés Baumé, telle que celle de Danet et Laisné [**10**].

Mais au cours d'une récente publication P. Morand et J. Dufau-Casanabe [**46**] affirment que les résultats ne sont pas fidèles et que la mesure opacimétrique des protéines est trop incertaine pour être retenue comme moyen clinique de dosage de la protéinorachie. De plus, à l'aide d'un échantillon moyen intéressant 150 sérums, ils étalonnent deux photomètres : le titre d'un sérum quelconque déterminé par référence à la courbe étalon (l'étalonnage se fait à partir d'un mélange pondéralement titré en protides totaux — Danet et Laisné —) est entaché d'une erreur inacceptable due aux variations des fractions protéiques. Les auteurs le prouvent en traçant les courbes opacimétriques de l'albumine et des γ globulines pures : elles sont très différentes, et leur combinaison est différente de l'étalon. Cela tient à ce que les règles relatives aux dimensions des particules protéiques ne sont pas respectées.

Nous voyons donc que les techniques néphélémétriques, qui

sont pourtant encore fort usitées en clinique ou en laboratoire, ne peuvent prétendre qu'à réaliser un étalonnage assez grossier.

De cette rapide étude, il ressort que le choix d'une méthode de référence pour le dosage de l'azote protéique se porte sur la méthode de Kjeldahl. Aussi adopterons-nous la technique la plus classique, à savoir : la microméthode utilisant l'appareil de Parnas et Wagner qui permet le dosage de 0,5 à 2 mg. d'azote protéique avec une précision de 0,5 à 1 p. 100.

Nous allons maintenant passer en revue les différents procédés proposés pour le dosage colorimétrique des protéines.

III. – MICRODOSAGE COLORIMÉTRIQUE DES PROTÉINES.

On sait que les protéines donnent un certain nombre de réactions colorées servant à leur identification et qui sont en réalité des réactions de certains acides aminés entrant dans leur constitution, ou de certaines liaisons entre acides aminés. Rappelons les principales d'entre elles :

1° Réaction de Millon : les solutions de tyrosine en présence de sulfate mercurique et d'ions nitreux se colorent en rouge-orangé.

2° Réaction d'Adamkiewicz : le tryptophane, en milieu sulfurique concentré, donne avec l'acide glyoxalique une coloration violette.

3° Réaction de Sakaguchi : les solutions alcalines d'arginine ou de dérivés guanidiques se colorent en rouge par addition d'α naphtol et d'hypobromite de sodium.

4° Réaction xanthoprotéique : si l'on traite une solution de protéines par une solution aqueuse d'acide nitrique, il apparaît un coagulum jaunâtre surmonté d'une solution jaune. Si par la suite, on alcalinise par de l'ammoniaque, la teinte fonce en virant à l'orangé.

5° Réaction du biuret : si à une solution protéique alcalinisée par la soude ou la potasse on ajoute une petite quantité de sulfate de de cuivre, il apparaît une coloration violette.

6° Réaction à l'acide phospho-18-tungstomolybdique : si l'on traite une solution de protéines par l'acide phosphotungstomolybdique, en milieu alcalinisé par du carbonate de sodium, il se développe une coloration bleue.

7° Réaction de Pauly : la tyrosine et l'histidine donnent une coloration rouge intense lorsqu'on les traite, en solution alcaline, par l'acide sulfanilique ou les acides similaires, fraîchement diazotés.

Ces réactions méritent d'être décrites plus en détail afin de voir celles qui sont susceptibles d'être appliquées au dosage colorimétrique de l'azote protéique.

1. — *Réaction de MILLON.*

En 1849, M. E. Millon [**44**] montra que lorsque du mercure est dissout dans un poids égal d'acide nitrique et que 4,5 fois son poids d'eau est ajouté, le mélange résultant qui contient $Hg(NO_3)_2$, $Hg\,NO_3$, $Hg\,NO_2$, HNO_2, HNO_3, etc... donne un précipité rouge quand il est chauffé avec des protéines et une solution rouge stable lorsqu'il est chauffé avec les hydrolysats acides ou alcalins de protéines.

Indépendamment, en 1853, Hoffmann [**30**] s'aperçut que la tyrosine donnait une coloration rouge quand on la chauffait avec du nitrite mercureux dans l'acide nitrique.

Quelques années plus tard, en 1901, Nasse [**47**] montra que lorsque la tyrosine et les autres phénols sont laissés en contact avec les sels mercuriques pendant un certain temps, et qu'ils sont traités par une solution diluée de nitrite de sodium, il se développe la typique coloration rouge de Millon.

Zuwerkalow [**62**], en 1927, n'hydrolyse pas la protéine mais la dissout dans la soude diluée. Mais alors, la présence de tryptophane augmente les résultats. C'est pourquoi, en 1942, Rossi [**50**] détruit le tryptophane par hydrolyse à l'acide chlorhydrique.

En 1938, Bernhart [**3**] hydrolyse par la soude, ajoute un excès de réactif au sulfate mercurique dans l'acide sulfurique, et dose la tyrosine par colorimétrie dans le filtrat après addition de soude. Le complexe tryptophane-mercure est éliminé par centrifugation.

Mais la méthode la plus employée de nos jours est toujours celle que préconisa Lugg [**41**] en 1937.

Réactifs.

I. — Solution de tyrosine contenant 0,25 à 1 mg de tyrosine par ml, avec SO_4H_2 0,1 N ou NaOH 0,05 N.

II. — A 770 ml d'eau distillée, on ajoute 79 ml. d'acide sulfurique concentré, puis 75 gr. de sulfate mercurique

purifié, 55 gr. de chlorure mercurique, 70 gr. de sulfate de sodium. On dissout en agitant et on complète à 1.000 ml. avec de l'eau distillée.

III. — Solution II diluée au demi par SO_4H_2 N.

IV. — Solution de nitrite de sodium à 6,9 p. 100 fraîchement préparée.

Mode opératoire : Dans un tube à centrifuger conique en pyrex, on met un volume de solution de tyrosine, ou d'hydrolysat, égal au plus à 5 ml. ; on complète à 5 ml., si besoin est, par de l'acide sulfurique 0,7 N. On ajoute 5 ml. de solution II, et on porte pendant 30 minutes au bain-marie à 60° c. On refroidit sous un courant d'eau et on complète à 25 ml. avec la solution III. On ajoute alors 0,5 ml. de solution IV. Il se développe une coloration rouge. Après agitation, et s'il y a lieu, centrifugation des fines particules de composés mercuriques en suspension, on mesure l'intensité d'absorption dans les 15 minutes au photomètre de Pulfrich en cuves de 2 cm à une longueur d'onde de 500 mμ.

Les prises d'essai doivent contenir de 0,25 mg. à 1 mg. de tyrosine. Le dosage se fait avec une bonne précision puisque les erreurs ne dépassent pas 2 p. 100. Malheureusement, la méthode ne connaît pas d'application pratique au dosage colorimétrique de l'azote protéique.

2. — *Réaction à l'ACIDE GLYOXALIQUE.*

Réaction d'Adamkiewicz : le tryptophane donne en milieu sulfurique concentré une intense coloration violette avec l'acide glyoxalique. Hopkins et Cole [**31**] en 1901, puis Cary [7] en 1926 hydrolysent enzymatiquement une protéine, puis précipitent le tryptophane à l'état de complexe mercurique en milieu sulfurique. Le réactif à l'acide glyoxalique est préparé ainsi : on réduit 100 ml. d'acide oxalique en solution saturée, à l'aide de 6 gr. d'amalgame de sodium à 5 p. 100 ; 1 ml. de filtrat clair est ajouté à 20 ml. d'acide sulfurique dilué (21 ml. SO_4H_2 concentré + 5 ml H_2O). On précipite le tryptophane par une solution à 15 p. 100 de sulfate mercurique dans de l'acide sulfurique à 5 p. 100 en volume. On remet le précipité obtenu en suspension dans 20 ml. de réactif glyoxylique. Puis on ajoute 4 gouttes d'une solution à 25 p. 100 de sulfate mercurique dans de l'acide sulfurique dilué au dixième. On laisse la coloration se développer à la température du laboratoire pendant 48 heures. On mesure l'intensité de la coloration produite au colorimètre, et on la compare à une solution-étalon.

La méthode fut ensuite modifiée successivement par Brice [6], Winkler [58], Benedict [2], Shaw et Mac Farlane [53].

Puis la préparation et la conservation du réactif glyoxalique présentant certains inconvénients, en 1954 C. Dumazert et R. Grangaud [18] ont cherché à obtenir un réactif de préparation facile, et de bonne conservation : pour cela, ils ont pensé à faire agir la soude sur le chloral. La réaction principale qui a lieu dans ces conditions conduit essentiellement à la formation de chloroforme et de formiate de sodium. Cependant, il se fait quelques réactions secondaires, et en particulier il y a formation d'une faible quantité d'acide glyoxalique, ce qui permet d'envisager une réaction colorée du type de celle d'Adamkiewicz. Les auteurs désignent sous le nom de « réactif pseudo-glyoxylique » la solution des produits de décomposition du chloral par la soude. Ils emploient, de plus, un réactif cupro-sulfurique contenant :

— SO_4H_2 pur (d = 1,83)		750 ml.
— solution de SO_4Cu cristallisé à 10 %		1 ml.
— eau distillée	q.s.p.	1.000 ml.

Cette méthode permet théoriquement, à l'égal de toutes celles basées sur les réactions d'Adamkiewicz de doser le tryptophane sans qu'il soit nécessaire d'hydrolyser la protéine. Cependant, cette façon de faire les ayant conduits à des résultats assez irréguliers, les auteurs réalisent une hydrolyse ménagée en milieu alcalin. Ils effectuent le dosage du tryptophane sur 2 ml. de l'hydrolysat neutralisé ; au bain-marie bouillant, il se développe une coloration violette.

La marge d'utilisation de cette technique s'étend de 0,050 à 0,250 mg. de tryptophane contenus dans une prise d'essai d'un volume fixe de 2 ml. La précision est de l'ordre de $\pm$ 2 %. La méthode est fidèle, la coloration très stable. Mais on ne peut considérer la réaction d'Adamkiewicz que comme une réaction colorée quantitative des protéines.

3. — *Réaction de SAKAGUCHI*

Découverte par Schulze et Steiger, l'arginine a pour formule :

$$NH = C < \begin{matrix} NH_2 \\ NH - CH_2 - CH_2 - CH - COOH \\ \qquad\qquad\qquad\quad | \\ \qquad\qquad\qquad\quad NH_2 \end{matrix}$$

Elle est caractérisée par son groupement guanidique.

Parmi les réactions de l'arginine, la plus brillante, la plus sensible et la plus spécifique est bien celle connue sous le nom de réaction de SAKAGUCHI [**51**].

Principe : La réaction de SAKAGUCHI consiste en la formation d'un pigment rouge qui prend naissance dans les solutions alcalines d'arginine ou de dérivés guanidiques, additionnées d'α naphtol et d'hypobromite alcalin. Elle est spécifique des dérivés guanidylés monosubstitués.

Primitivement, en 1925, SAKAGUCHI montra que l'arginine donne en présence d'α naphtol et d'hypochlorite de sodium, en milieu légèrement alcalinisé, une coloration rouge intense, mais instable. Aussi quelques travaux ont-ils eu pour but de perfectionner cette réaction en vue de l'adapter comme technique de dosage de l'arginine. C'est ainsi que WEBER [**55**] en 1930 remplaça l'hypochlorite par de l'hypobromite dont l'excès était ensuite détruit par addition d'urée, ce qui avait pour effet de stabiliser la coloration de façon suffisante pour permettre le dosage.

En 1932, JORPES et THOREN [**35**] utilisèrent les données de WEBER dans une technique utilisable pour le microdosage de l'arginine.

En France, l'application aux hydrolysats protéidiques en fut faite par Mlle JEAN [**33**] en 1934, tandis que des recherches ultérieures de DUMAZERT et POGGI [**20**] en 1939 améliorèrent encore cette technique en stabilisant la coloration, par ajout, 30 secondes après l'hypobromite, d'alcool à 95°, ou mieux, d'alcool additionné de 20 p. 100 de glycérol. C'est cette dernière technique que nous citerons puisqu'elle est encore universellement utilisée de nos jours. De légères modifications lui ont été apportées en 1944 par VINCENT et BRYGOO [**54**] qui utilisent une solution d'hypobromite diluée au dixième, et par ZALTA et Mme KHOUVINE [**61**] en 1953 qui remplacent l'urée par de l'uréthane.

Technique de DUMAZERT et POGGI.

Réactifs :

1. — Lessive de soude à 40%.
2. — Solution d'α-naphtol à 1% dans l'alcool à 95°, dilution au 1/5 de la solution précédente, préparée extemporanément.
3. — Solution d'hypobromite de sodium : 0,9 ml. de brome dans 100 ml. de lessive de soude à 10%.

4. — Alcool à 95° contenant 20% de glycerol.

5. — Solution d'urée à 40%.

Mode opératoire : La prise d'essai d'un volume fixe de 2 ml. doit contenir de 20 à 80 µg d'arginine. On la refroidit à 0°c dans la glace de même que tous les réactifs nécessaires. On ajoute à la prise d'essai refroidie : 0,25 ml. de lessive de soude à 20%, et 0,1 ml. de la solution diluée d'α naphtol. On agite. On laisse 15 minutes dans l'eau glacée, puis on ajoute 0,5 ml. de solution d'hypobromite de sodium. On agite et on attend exactement 30 secondes ; on ajoute alors 10 ml. d'alcool à 95° contenant 20% de glycérol et 1 ml. de solution d'urée à 40%. On agite et on lit colorimétriquement 5 à 10 minutes après. On fait un témoin.

L'intensité de la coloration obtenue suit la loi de BEER-LAMBERT.

Cette réaction permet le dosage précis des groupements guanidiques à 2 p. 100 près, en se rapportant à la courbe d'étalonnage qui affecte l'allure d'une droite. Mais le taux d'arginine dans les protéines étant variable, cette réaction n'a pu être utilisée quantitativement pour le dosage colorimétrique de l'azote protéique.

4. — *Réaction XANTHOPROTEIQUE.*

Principe : Si l'on traite à chaud une solution de protéines par une solution aqueuse d'acide nitrique, il apparaît un coagulum jaunâtre surmonté d'une solution jaune. Si par la suite on alcalinise par de l'ammoniaque, la teinte fonce en virant à l'orangé.

Pour que cette réaction puisse être appliquée colorimétriquement, il est évidemment nécessaire qu'il n'apparaisse pas de coagulum et que la solution reste limpide. Pour remplir cette condition, il suffit d'opérer sur des solutions de faible concentration en protéines : dans le cas des protéines sériques, une dilution de sérum au centième conviendra parfaitement. On obtiendra une liqueur colorée extrêmement limpide.

M. MACHEBŒUF et ses collaborateurs [**42**] ont fait une excellente étude de cette réaction. Ils se sont aperçus que les globulines et les albumines se comportaient très différemment dans cette réaction xanthoprotéique, ce qui était à prévoir car les teneurs en aminoacides qui interviennent ne sont pas égales. Ils ont alors été conduits à rechercher une concentration optimale en acide nitrique pour un mélange d'albumine et des globulines, et ont mis au point la technique suivante :

Technique de MACHEBŒUF.

Réactifs.

1. — Solution d'acide nitrique : on mélange 225 ml. d'acide nitrique concentré à 40° Baumé avec de l'eau en quantité suffisante pour amener au volume total de 1 litre.

2. — Ammoniaque concentrée à 22° Baumé.

Mode opératoire : On fait au préalable une dilution de sérum en en prélevant 0,2 ml. que l'on porte à 25 ml. avec de l'eau physiologique. La dilution obtenue contiendra de 500 à 1.000 µg de protéines totales par ml.

On mélange dans un tube à essai ordinaire 1 ml. de cette dilution de sérum, avec 2 ml. de la solution d'acide nitrique : le mélange obtenu contient 15% d'acide nitrique. On porte au bain-marie bouillant pendant 25 minutes (pour éviter l'évaporation, on obture l'orifice du tube à essai avec une petite ampoule de verre) ; puis on sort le tube pour le laisser refroidir 10 minutes environ. On ajoute alors 1,5 ml. d'ammoniaque concentrée à 22° Baumé et on attend 15 minutes au moins à la température ambiante. Finalement, on lit à l'électrophotomètre (appareil de Meunier ; $\lambda = 430$ mµ).

Il est indispensable de réaliser un témoin sans protéines, constitué par 1 ml. d'eau, 2 ml. de solution d'acide nitrique, puis 1,5 ml. d'ammoniaque.

Si l'on cherche la concentration optimale en acide nitrique à 40 degrés Baumé pour les albumines seules, on s'aperçoit qu'elle est de 33 p. 100 dans le mélange : solution d'albumines + acide nitrique. De même pour les globulines seules, cette concentration est de 33 p. 100, quelle que soit la fraction globulinique étudiée.

Mais des poids égaux d'albumines ou de globulines donnent alors des résultats très différents. Le dosage des protéines totales dans un mélange en proportions inconnues de globulines et d'albumines serait donc impossible directement, en opérant dans les conditions optimales de concentration en acide nitrique. Si l'on trace les courbes de l'intensité de coloration des albumines et des globulines en fonction de la concentration en acide nitrique, ces courbes se coupent en un point correspondant à une concentration de 15 p. 100. C'est pourquoi MACHEBŒUF et ses collaborateurs ont adopté cette concentration dans leur dosage. Pour obtenir des résultats convenables il faudra donc que cette condition de concentration en acide soit exactement réalisée, car une faible variation entraînerait des écarts considérables.

La durée de chauffage et celle de l'attente après l'addition d'ammoniaque ont été parfaitement déterminées ; leur mesure ne nécessite pas une grande précision, car une erreur de $\pm$ 2 minutes n'a pas d'influence notable sur le dosage.

La quantité d'ammoniaque ajoutée pour faire virer et foncer la teinte doit être mesurée exactement car elle correspond à un optimum de coloration.

Cette technique de dosage est valable pour tous les sérums, même si l'on s'adresse à un sérum particulièrement riche en l'une quelconque des fractions globuliniques α, β, γ. De plus elle est applicable aux recherches immunologiques et à la détermination de la protéinorachie. La précision est d'environ 3 p. 100.

Les ions minéraux présents dans le sérum sont sans action notable sur la réaction colorée dans les limites de concentration où on peut les rencontrer dans les solutions diluées auxquelles est adaptée la méthode. Mais si l'on veut appliquer cette technique à des solutions de fortes concentrations en sels (jusqu'à 15%), il y aura un effet tampon considérable et l'on ne pourra avoir des résultats convenables. On sera donc amené dans ce cas à employer une technique qui ne soit pas sensible à ce que nous appellerons « l'erreur de sels ».

5. — *Réaction du BIURET.*

Principe : Quand on ajoute à une solution de protéines et de polypeptides, alcalinisée par la soude ou la potasse, une petite quantité de sulfate de cuivre, il apparaît une coloration violette qui est caractéristique de la juxtaposition de plusieurs liaisons peptidiques (— CO — NH — CH — CO — NH — CH — ...).

La détermination quantitative des protéines par évaluation colorimétrique, ou mieux encore électrophotométrique, a été préconisée dès 1914 par Riegler [**49**]. Depuis une vingtaine d'années cette méthode a retenu l'attention des biochimistes par suite, probablement, de sa grande simplicité, bien qu'en elle-même elle ne soit pas plus spécifique des protéines que d'autres méthodes colorimétriques.

Un nombre imposant de techniques a été proposé. Elles ne diffèrent les unes des autres que par quelques détails, sans que le plus souvent l'importance de ces détails soit expérimentalement justifiée. Ceci semble indiquer à la fois l'intérêt qui s'attache à la méthode, et les incertitudes rencontrées par les usagers, chacun de ceux-ci étant ainsi amené à proposer quelques modifications.

En 1935, FINE [22] adapte la méthode au dosage des protéines sériques et décrit ainsi sa technique : il fait une précipitation trichloracétique et reprend le précipité par la soude ; il ajoute du sulfate de cuivre, centrifuge pour précipiter la suspension d'hydroxyde de cuivre et compare colorimétriquement la liqueur surnageante avec celle obtenue de la même manière, à partir d'un sérum stock étalonné par microkjeldahl.

En 1942, KINGSLEY [37] propose une méthode nouvelle ne faisant appel qu'à un seul réactif, qui mélangé au sérum, fournit directement et sans précipitation préalable, un milieu propre à la colorimétrie. Mais son réactif est instable. Des réactifs uniques, stabilisés, ont été proposés plus récemment : en particulier le réactif de GORNALL, BARADWILL et DAVID [27] stabilisé au tartrate, permet de bonnes mesures de la protéinémie ; c'est pourquoi il a été adopté par DUSTIN [21], puis par FLEURY et Mlle EBERHARD [24] ; WEICHSELBAUM [56] utilise en plus une solution urée-thymol ; sa technique est utilisée par de nombreux biologistes.

En 1951, JAYLE, BOUSSIER et BADIN [32] mettent au point une technique simple que nous utiliserons par la suite, et que nous allons décrire :

Technique de JAYLE.

Réactifs.

1. — Solution de chlorure de sodium à 9 °/₀₀.

2. — Solution alcaline de complexe cuivrique :

SO_4Cu cristallisé, 5 H_2O, R.P. ...	0,235	gr.
Tartrate double de Na et K.....	0,94	gr.
Soude en pastilles	4,60	gr.
Eau ..... q.s.p.	100	ml.

Dans un ballon jaugé de 100 ml. on met le sulfate de cuivre avec environ 40 ml. d'eau. On dissout et on ajoute le tartrate double de sodium et de potassium. D'autre part, on dissout la soude dans 50 ml. d'eau, et on ajoute cette solution à la précédente. On agite, on attend le refroidissement complet, et on complète au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Mode opératoire : Dans un tube à hémolyse, on met : 0,1 ml. de sérum et 0,9 ml. d'eau physiologique. Puis on ajoute 4 ml. de réactif cuivrique, on agite. Dans un deuxième tube (témoin), on met 1 ml.

d'eau physiologique et 4 ml. de réactif cuivrique. On agite. On attend 20 minutes et on lit l'intensité de la coloration à l'électrophotomètre. Nous avons pour notre part utilisé l'appareil de Jean et Constant à une longueur d'onde de 540 mμ.

Le rapport des concentrations cuivre/protéine joue un rôle essentiel : s'il est bas (inférieur à 1) on obtiendra des tons rosés ; s'il est plus élevé (de 1 à 1,5) on aura une gamme de colorations violettes faciles à lire à l'électrophotomètre. Si enfin il est haut (supérieur à 2), on obtiendra des tons si bleus que leur estimation colorimétrique en présence d'ions cuivre en est rendue difficile. Il convient donc d'effectuer le dosage dans le cas où ce rapport se situe entre 1 et 1,5. C'est le cas de notre méthode. D'autre part, Shaffert et Somogyi [**52**] se sont aperçus qu'il fallait au moins 3 parties de tartrate pour 1 de cuivre pour assurer une bonne conservation du réactif. Mais le tartrate a une action inhibitrice sur l'intensité de la coloration et sur la vitesse de son développement, c'est pourquoi il faut attendre vingt minutes pour lire à l'électrophotomètre.

Le biuret est une méthode dont la précision est moyenne : environ 3 p. 100. Pour effectuer un bon dosage il faut que la prise d'essai contienne environ 3 mg. de protéine ; la méthode n'est donc pas très sensible. D'autre part, nous nous sommes aperçus que la coloration était influencée par une forte concentration en sels, ce qui peut être gênant dans certains cas. De plus, comme l'ont expérimenté Fleury et Mlle Eberhard, la simplicité de mise en œuvre de la méthode, ne conduit pas forcément à la fidélité dans les résultats, surtout si l'on cherche à donner à cette méthode la précision imposée par certaines recherches.

En résumé, la méthode répond bien aux exigences de simplicité et de rapidité que demande une solution pratique du dosage des protéines, ou indirectement de l'azote protéique mais malheureusement, la rapidité semble obtenue aux dépens de la précision. De plus la méthode est sensible à « l'erreur de sels ».

6. — *Méthodes utilisant l'ACIDE PHOSPHO 18 TUNGSTOMOLYBDIQUE.*

En 1922 au cours de l'étude de certaines réactions du sang dans des cas de Kala-Azar, H. Wu [**59**] fut amené à déterminer quantitativement les différentes protéines du plasma : il isolait la fibrine par recalcification du plasma oxalaté, puis les albumines et les globulines par précipitation avec une solution à demi-saturation de sulfate d'ammonium en quantité définie. Les précipités d'albumines et de globulines étaient solubilisés, puis reprécipités par

l'acide tungstique pour purification, et enfin redissous dans une solution diluée de carbonate de sodium. Wu terminait son dosage par l'appréciation au colorimètre de la réaction colorée obtenue en ajoutant de l'acide phospho-18-molybdotungstique (phénol reagent). L'étalon servant à la comparaison colorimétrique était préparé avec de la tyrosine pure.

En 1927, O. Folin et V. Ciocalteu [**25**] mettent au point la formule du réactif que nous utiliserons dans nos recherches et dont la préparation est décrite p. **38**.

La partie active de ce réactif est l'acide phosphotungstomolybdique.

De nombreux auteurs utilisèrent ce réactif : ainsi Wu et Ling [**60**] en 1927, Andersch et Gibson [**1**] en 1933, Greenberg et Mirolubova [**28**] en 1936, Minot et Keller [**45**], la même année, proposèrent des procédés analytiques adaptant le réactif de Folin-Ciocalteu à la détermination des protéines sériques. D'autres l'utilisèrent en immunologie.

C'est en 1951 que Lowry [**40**] et ses collaborateurs imaginèrent d'employer le réactif avec du cuivre. Ils proposèrent la méthode suivante :

Technique de LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL.

Réactifs.

A. — 2 p. 100 de CO_3Na_2 dans NaOH 0,1 N.

B. — 0,5 p. 100 de SO_4Cu, 5 H_2O dans une solution à 1 p. 100 de tartrate de K et Na.

C. — 50 ml. de réactif A + 1 ml. de réactif B, ce réactif ne se conserve qu'un jour.

D. — Phenol reagent dilué : on titre 1 ml. de « phenol reagent » de Folin et Ciocalteu, par de la soude 0,1 N en présence de phénol-phtaleine. On ramène le réactif à normalité acide par addition d'eau distillée.

Mode opératoire : Dans un tube à hémolyse on met 1 ml. de solution protéique convenablement diluée : la prise d'essai doit contenir de 10 à 40 µg d'azote environ. On ajoute 5 ml. de réactif C et on agite. On attend 10 minutes au moins à la température du laboratoire. On ajoute alors 0,5 ml. de réactif D ; on agite vigoureu-

sement et on attend 30 minutes. On fait un témoin. On lit à l'électrophotomètre en cuves de 1 cm à $\lambda = 750$ mμ,

Deux réactions sont mises en jeu :

a) une action première de la protéine et du cuivre en milieu basique, qui semble se rapporter à la réaction du biuret ;

b) une réduction de l'acide phosphotungstomolybdique du réactif par le complexe cuivre-protéine, par la tyrosine et le tryptophane contenus dans la protéine.

A pH 10 le développement de la coloration est optimum. Le réactif de Folin et Ciocalteu ne demeure sensible que pour quelques secondes, car il est détruit par l'alcalinité du milieu. C'est pour cette raison que le mélange final doit être fait rapidement et agité énergiquement.

La tyrosine et le tryptophane donnent des colorations en l'absence de cuivre, mais le reste de la protéine ne donne aucune coloration sans ce métal. Avec les plasmas et le liquide céphalo-rachidien la coloration des protéines dépend pour 75% de la présence de cuivre.

En 1952, Daughaday, Lowry, Rosebrough et Fields [11] adaptent la méthode au dosage du liquide céphalo-rachidien : ils opèrent sur une prise d'essai de 0,2 ml. à laquelle ils ajoutent 10 ml. d'un réactif préparé extemporanément à partir des réactifs suivants :

Réactif I : 20 gr. de CO_3Na_2 ; 0,5 gr. de tartrate de Na } pour 1 litre de NaOH 0,1 N

Réactif II : 1 gr. de SO_4Cu, 5 H_2O ; eau distillée, q.s.p. 1 litre.

Leur réactif (n° III) contient 45 ml. de réactif I et 5 ml. de réactif II.

Après 15 minutes ils ajoutent 1 ml. de réactif de Folin dilué ; après une attente de 30 minutes ils lisent au photocolorimètre Klett à $\lambda = 750$ mμ.

L'étalonnage est réalisé au moyen du spectrophotomètre Beckman.

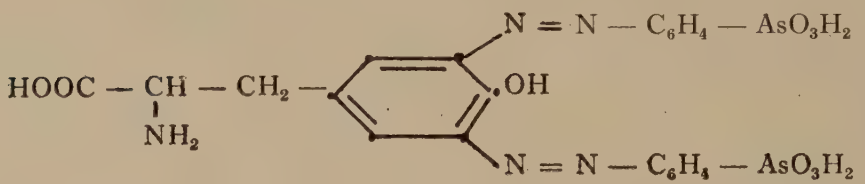
Mais l'étalonnage de la méthode de Daughaday et ses collaborateurs nous paraît insuffisant, c'est pourquoi nous reprendrons dans nos recherches personnelles l'analyse de la protéinorachie.

Par ailleurs, le dosage ne peut se faire si l'on opère dans un milieu de forte concentration en sels, car il apparaît un précipité qui empêche la lecture colorimétrique.

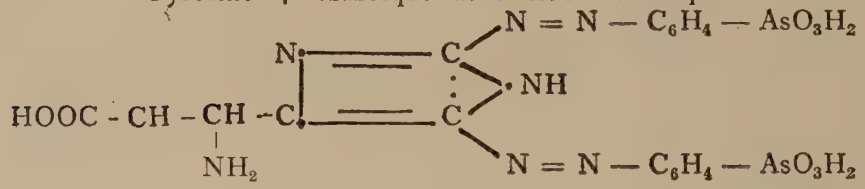
7. — *Réaction de PAULY.*

En 1904, PAULY [48] signale que, de tous les amino-acides connus que l'on trouve dans les hydrolysats protéiques, seules la tyrosine et l'histidine donnent une coloration rouge intense lorsqu'elles sont traitées en solution alcaline par l'acide sulfanilique ou les acides similaires, fraîchement diazotés.

En 1915, l'auteur propose les structures suivantes :



Tyrosine + diazoïque de l'acide arsenilique.



Histidine + diazoïque de l'acide arsenilique.

En 1913 WEISS et SSOBOLEW [57] emploient la méthode de PAULY, en l'absence de tyrosine, c'est-à-dire quand la réaction de MILLON est négative. L'histidine peut être précipitée soit à neutralité par un mélange de chlorure mercurique et de carbonate de sodium, soit en milieu faiblement alcalin par un mélange de nitrate d'argent et de baryte. Le diazoïque de l'acide sulfanilique, est préparé en mélangeant 4 gr. d'acide sulfanilique, 40 ml. d'acide chlorhydrique concentré, 400 ml. d'eau distillée et en ajoutant au moment de l'emploi deux volumes de solution de nitrite de sodium à 0,5 p. 100. A 10 ml. de solution d'histidine au 1/10.000, on ajoute 1,5 ml. de réactif à l'acide para-diazobenzène sulfonique et 3 ml. de solution de carbonate de sodium à 10 p. 100. On lit au développement optimum de la coloration. Par la suite, des modifications à cette méthode furent apportées par KOESSLER et HANKE [38], JORPES [34], LANG [39], MACPHERSON [43].

En 1949 D. Bolling [4] sépare la tyrosine et l'histidine sur papier à chromatographie. Les chromatogrammes sont vaporisés avec les réactifs de Pauly et les quantités d'histidine et de tyrosine sont déterminées par rapport à l'intensité de coloration et à la surface des taches.

Mais la réaction colorée née de la copulation de certains diazoïques avec les protéines n'a jamais été utilisée jusqu'à nos jours par les auteurs pour le dosage colorimétrique de l'azote protéique. Aussi nous nous proposons de consacrer un chapitre de nos recherches à l'étude d'une telle réaction.

Nous venons de passer en revue les principales réactions utilisées pour l'identification des protéines, et nous avons vu qu'un certain nombre d'entre elles ont été appliquées à des dosages colorimétriques. Tel est le cas de la réaction xanthoprotéique, de celle du biuret et de la réduction de l'acide phosphotungstomolybdique (Folin).

La plus simple de ces méthodes est celle basée sur la réaction du biuret qui permet de doser 3 mg. de protéines à 3 p. 100 près.

La méthode basée sur la réaction xanthoprotéique et proposée par Macheboeuf est beaucoup plus sensible puisqu'elle permet d'abaisser la prise d'essai de protéines à 0,5 mg. mais elle paraît d'une exécution beaucoup plus délicate en raison de la précision avec laquelle il faut respecter la concentration finale en acide nitrique.

La technique de Lowry et ses collaborateurs apparaît de loin comme la plus sensible et la plus précise ; elle permet le dosage de protéines sériques sur des prises d'essai de l'ordre de 0,1 mg. avec une précision de l'ordre de 1 p. 100. Ces auteurs ont également appliqué leur technique au microdosage colorimétrique de la protidorachie. Néanmoins, dans ce cas leur travail ne fait pas état de comparaisons entre les résultats obtenus par leur méthode et ceux donnés par une technique de référence convenablement choisie.

Dans l'ensemble, il existe donc à l'heure actuelle un certain nombre de méthodes de dosage colorimétrique des protéines qui ont fait l'objet d'intéressantes applications. Cependant nous devons souligner ici, que toutes ces méthodes s'avèrent inapplicables dans le cas, assez fréquemment rencontré, où il s'agit d'un dosage de protéines en présence d'une concentration élevée en sels (sulfate de sodium, phosphate de potassium, utilisés pour séparer les protéines par relargage).

Nous avons en effet constaté, que dans de telles conditions, l'intensité de la coloration est très nettement affaiblie, et qu'un trouble important se manifeste parfois, rendant la colorimétrie impossible ;

la présence de sels doués d'un puissant effet tampon (phosphates mono et dipotassiques) rend absolument aléatoire l'emploi de la réaction xanthoprotéique (méthode de MACHEBŒUF et coll., p. 25), car la concentration en acide nitrique libre ne peut plus être respectée. Enfin, tous les sels, à partir d'une certaine concentration, inhibent à des degrés divers et souvent très importants, le développement de la coloration bleue relative à la méthode du « phenol reagent » (technique de LOWRY, p. 30).

IV. – OBJET DU TRAVAIL.

De notre brève introduction, il ressort essentiellement qu'il y aurait intérêt à mettre au point une micro-méthode de dosage colorimétrique des protéines indifférente aux causes d'erreur qu'introduit bien souvent la présence de sels dès que leur concentration s'élève au-dessus de 5 p. 100.

Par ailleurs, l'ensemble des réactions caractéristiques des protéines permet de choisir parmi elles un principe n'ayant pas encore fait l'objet d'une application quantitative. Tel est le cas de la formation de diazo-composés réservés jusqu'à aujourd'hui à la caractérisation de la tyrosine et de l'histidine.

Enfin, en raison de l'importance que revêt la détermination de la protéinorachie et de l'insuffisance des techniques opacimétriques actuellement utilisées (voir P. MORAND), nous avons cru utile d'éprouver d'une façon plus précise que ne l'ont fait les auteurs, la technique proposée par LOWRY et ses collaborateurs.

En résumé, notre travail a essentiellement pour objet :

1° d'établir nettement la valeur de la méthode colorimétrique de dosage de la protidorachie mettant en œuvre le réactif phosphotungstomolybdique de Folin et Ciocalteu ;

2° de mettre au point une microméthode de dosage colorimétrique des protéines, fondée sur la formation de diazo-composés dans l'espoir de pouvoir ainsi proposer une méthode pratiquement insensible à la présence d'un excès de sels dans le milieu.

RECHERCHES PERSONNELLES

PREMIÈRE PARTIE

SUR LE MICRODOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE LA PROTÉINORACHIE.

Ainsi que nous l'avons déjà vu, le réactif phospho-18-tungsto-molybdique de Folin et Ciocalteu, lorsqu'on l'emploie en milieu alcalin et en présence de cuivre, est un réactif excessivement commode et sensible pour le dosage colorimétrique des protéines, et en particulier pour la détermination de la protéinorachie. Auparavant, ce réactif s'employait sans cuivre : il en résultait une coloration faible et variable, ce qui expliquait l'utilisation limitée des techniques préconisées. Mais depuis les modifications apportées par LOWRY et ses collaborateurs, il semble que le réactif de Folin et Ciocalteu mérite d'être employé plus fréquemment en laboratoire.

Le but de notre travail est d'essayer de prouver la validité de la méthode colorimétrique de LOWRY en comparant les résultats qu'elle fournit à ceux obtenus par le microkjeldahl, qui ainsi que nous l'avons vu dans les pages précédentes, est la méthode de référence la plus sûre pour la détermination quantitative de l'azote protéique.

A) **Dosage colorimétrique.**

RÉACTIFS UTILISÉS.

Réactif A :

Carbonate anhydre de sodium		2 gr.
Solution de soude 0,1 N	q.s.p.	100 ml.

Réactif B :

Sulfate de cuivre cristallisé SO_4Cu, 5 H_2O		0,5 gr.
Tartrate double de sodium et de potassium		1 gr.
Eau distillée.....	q.s.p.	100 ml.

Réactif C :

Réactif A	50 ml.
Réactif B.....	1 ml.

Ce réactif doit être préparé extemporanément car il ne se conserve que 24 heures.

Réactif D :

Réactif de Folin et Ciocalteu : dans un ballon rodé et à fond rond de 750 ml., on met :

— tungstate de sodium	20 gr.
— molybdate de sodium.....	5 gr.

On fait dissoudre dans 140 ml. d'eau distillée. On ajoute alors :

— acide phosphorique concentré..	10 ml.
— acide chlorhydrique.....	20 ml.

On chauffe à l'ébullition, avec un réfrigérant à reflux pendant 10 heures. On ajoute alors :

— sulfate de lithium	30 gr
— eau distillée	10 ml.
— brome : quelques gouttes pour avoir une coloration jaune.	

Le réactif ne doit pas être vert, car alors il contiendrait des produits de réduction de couleur bleue.

On fait bouillir à l'air libre pendant 15 minutes pour chasser le brome en excès. On laisse refroidir. On porte à 200 ml. avec de l'eau distillée. Cette solution est environ deux fois normale. Après titrage par une solution de soude décinormale en présence de phénolphtaléine, on la ramène à normalité acide par addition d'eau distillée.

Le réactif doit être conservé dans un flacon bien bouché, coloré en jaune, et placé à l'abri de la lumière.

Mode opératoire : Dans un tube à hémolyse on introduit une prise d'essai de liquide céphalo-rachidien, ou d'une dilution de ce liquide, d'un volume fixe de 1 ml. On y ajoute 5 ml. de réactif C et on agite. On attend au moins dix minutes et on ajoute rapidement 0,5 ml. de réactif D. On agite énergiquement. On laisse la coloration bleue se développer pendant exactement 30 minutes. Un essai témoin est préparé de façon identique en remplaçant le liquide céphalo-rachidien par de l'eau distillée.

On lit l'intensité de la coloration au spectrophotomètre de M. Jean et R. Constant, en cuves de 1 cm d'épaisseur et à une longueur d'onde $\lambda = 750$ mμ. Cette longueur d'onde a été déterminée par l'étude du spectre d'absorption dont nous reproduisons le graphique dans la figure (1).

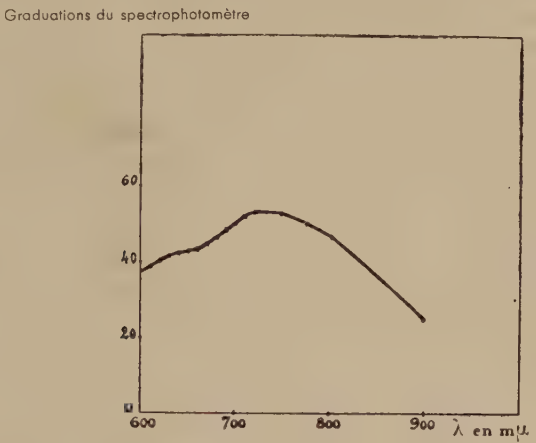


Fig. I. — Spectre d'absorption des produits de la réaction de Lowry sur les protéines de L.C.R.

B) **Etalonnage.**

1. — *Principe.*

On titre l'azote protéique d'un liquide céphalo-rachidien ou d'un mélange de liquides céphalo-rachidiens par le microkjeldahl. D'autre part, sur des prises d'essai différentes du même liquide céphalo-rachidien, on effectue le dosage colorimétrique dont le mode opératoire est exposé plus haut. On tracera la courbe d'étalonnage en portant en abscisse les valeurs de l'absorption lumineuse et en ordonnée les quantités correspondantes d'azote protéique apportées par les différentes prises d'essai du liquide céphalo-rachidien dont la teneur en azote a été déterminée par microkjeldahl.

2. — *Dosage de l'azote protéique par le microkjeldahl.*

Principe : Par addition de soude et d'une solution de sulfate de cadmium dans la prise d'essai, il se forme un précipité d'hydrate

de cadmium qui entraîne les protéines tandis que les constituants azotés non protéiques restent en solution. On lave ce précipité, on le redissout dans l'acide sulfurique et on dose l'azote protéique par le microkjeldahl sur la solution obtenue.

Réactifs utilisés.

1. — Solution cadmique de Fujita et Iwatake [**26**] 8 fois concentrée.

Sulfate de cadmium cristallisé		104 gr.
Solution normale d'acide sulfurique.		508 ml.
Eau distillée	q.s.p.	1.000 ml.

2. — Solution normale de soude.

3. — Solution normale d'acide sulfurique.

Mode opératoire : On introduit dans un tube à centrifuger conique une prise d'essai de liquide céphalo-rachidien contenant environ 1 mg. d'azote protéique, puis 2 ml. de solution 1 et enfin 2,2 ml. de réactif II que l'on verse goutte à goutte en ayant soin d'agiter tout au long de l'opération. Il se fait un précipité d'hydrate de cadmium qui entraîne avec lui les protéines, tandis que les constituants azotés non protéiques restent en solution. On centrifuge et on se débarrasse du liquide surnageant. On remet le précipité en suspension dans l'eau distillée, on centrifuge à nouveau et on jette l'eau de lavage. De la même manière on fera deux autres lavages. On redissout alors le précipité dans 2,2 ml. de solution normale d'acide sulfurique (réactif III). La solution obtenue contient toutes les protéines et ne renferme plus d'autres corps azotés. On l'entraîne alors sans pertes dans un matras à kjeldahl. On y ajoute une micromesure (environ 50 mg.) de mélange minéralisateur de C. Dumazert et Y. Marcelet [**19**] contenant 1 gr. de sélénite mercurique et 24 gr. de sulfate de potassium pur. On introduit alors dans le matras, 2 ml. d'acide sulfurique concentré et pur. On fait évaporer l'eau à feu doux et en agitant ; si besoin est, on ajoutera quelques gouttes d'alcool butylique pour éviter la production de mousses. On termine la minéralisation sur la rampe à gaz. On dose alors l'azote protéique par la microméthode classique de Kjeldahl que nous avons exposée précédemment. Simultanément, on prépare un essai-témoin en opérant de façon identique, mais en remplaçant le liquide céphalo-rachidien par de l'eau distillée.

Pour le mélange de liquides céphalo-rachidiens sur lequel nous avons effectué notre étalonnage, nous avons opéré sur une prise d'essai de 15 ml., et nous avons obtenu les résultats suivants :

témoin : 9,15 ml. de NaOH N/70 - coefficient C = 1,00
essai : 4,75 ml. de NaOH N/70 - coefficient C = 1,00

Notre prise d'essai contenait donc :

(9,75 — 4,75) 0,2 = 0,88 mg. d'azote protéique.
1 ml. de mélange analysé contient donc 0,88/15 = 0,0586 mg. d'azote protéique

soit 0,372 mg. de protéines.

En effet, la teneur moyenne des protéines en azote étant sensiblement constante, il suffit pour obtenir les résultats exprimés en protéines de multiplier les quantités d'azote protéique obtenues par un coefficient C = 6,35.

3. — *Dosage colorimétrique.*

Avec le même échantillon de liquide céphalo-rachidien nous avons effectué notre dosage sur différentes prises d'essai et nous avons obtenu les résultats que nous avons groupés dans le tableau suivant.

TABLEAU N° 1

Colorimétrie effectuée selon la technique de LOWRY sur des prises d'essai différentes d'un même liquide céphalo-rachidien.

N° des tubes	Prise d'essai en ml. de liquide céphalo-rachidien	Eau distillée en ml.	Graduations du spectrophotomètre
1	0,10	0,90	18,50
2	0,25	0,75	37,50
3	0,40	0,60	54,50
4	0,50	0,50	64,50
5	0,75	0,25	85,50

Sachant, d'après le microkjeldahl que 1 ml. de mélange de liquides céphalo-rachidiens analysé contient 58,6µg d'azote protéique (soit 372µg de protéines), nous pouvons dresser le tableau suivant.

TABLEAU N° II.

Etalonnage du dosage colorimétrique de la protéinorachie.

Volume de la prise d'essai de L.C.R.	Quantités d'azote protéique dans la prise d'essai (en µg.)	Résultats exprimés en protéines	Graduations du spectrophotomètre
0,10	5,86	37,2	18,50
0,25	14,65	93	37,50
0,40	23,40	148,60	54,50
0,50	29,30	186	64,50
0,75	43,95	279	85,50

Nous avons ainsi déterminé cinq points de la courbe d'étalonnage qui nous permet d'obtenir pour une lecture donnée au spectrophotomètre la quantité d'azote protéique contenu dans l'échantillon correspondant. Nous pouvons donc établir le graphique dont nous donnons la reproduction p. 42 (fig. II).

Pour faciliter les calculs, lors du dosage clinique, nous avons établi le graphique de la fig. III, en portant en abscisse les graduations du spectrophotomètre et en ordonnée les quantités correspondantes de protéines calculées en multipliant par 6,35 les résultats correspondants des dosages d'azote protéique.

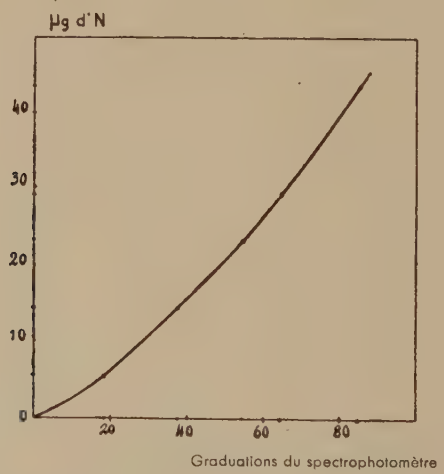


Fig. II. — Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique de l'N. protéique du L.C.R. par la méthode de Lowry.

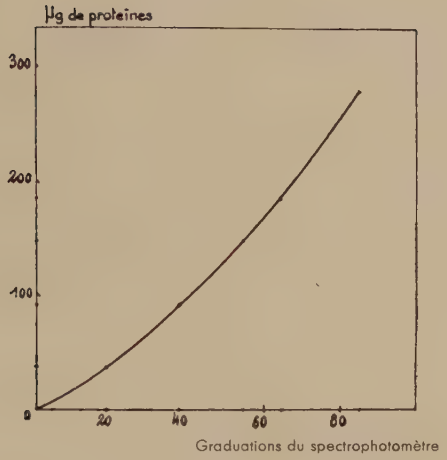


Fig. III. — Courbe d'étalonnage du dosage colométrique de la protidorachie par la méthode de Lowry.

C) Détermination de quelques protidorachies par la méthode colorimétrique étudiée.

Nous avons dosé les protéines totales de 100 liquides céphalo-rachidiens par colorimétrie à l'aide du réactif de Folin et Ciocalteu. Les résultats ont été classés en :

1° Protidorachies normales : moins de 0,30 gr. de protéines par litre de L.C.R. ;

2° Protidorachies suspectes : de 0,30 à 0,50 gr. de protéines par litre de L.C.R. ;

3° Hyperprotidorachies : plus de 0,50 gr. de protéines par litre de L.C.R.

TABLEAU III.

Protidorachies normales.

N° de l'échantillon	Résultats en g. de protéines par litre de L.C.R.	N° de l'échantillon	Résultats en g. de protéines par litre de L.C.R.	N° de l'échantillon	Résultats en g. de protéines par litre de L.C.R.
1	0 25	11	0 17	21	0.24
2	0,29	12	0,27	22	0,22
3	0,25	13	0,22	23	0,15
4	0,24	14	0,25	24	0,26
5	0,17	15	0,07	25	0,23
6	0,18	16	0,23	26	0,18
7	0,19	17	0,28	27	0,28
8	0,15	18	0,20	28	0,17
9	0,21	19	0,16	29	0,17
10	0,25	20	0,29	30	0,24

TABLEAU IV.

Protidorachie suspectes

N° de l'échantillon	Résultats en g. de protéines par litre de L.C.R.	N° de l'échantillon	Résultats en g. de protéines par litre de L.C.R.	N° de l'échantillon	Résultats en g. de protéines par litre de L.C.R.
31	0,43	39	0,46	47	0,36
32	0,33	40	0,34	48	0,38
33	0,45	41	0,34	49	0,30
34	0,42	42	0,39	50	0,32
35	0,37	43	0,36	51	0,30
36	0,46	44	0,42	52	0,36
37	0,47	45	0,30	53	0,41
38	0,41	46	0,34		

TABLEAU V.

Hyperprotidorachies.

N° de l'échantillon	Résultats en g. de protéines par litre de L.C.R.	N° de l'échantillon	Résultats en g. de protéines par litre de L.C.R.	N° de l'échantillon	Résultats en g. de protéines par litre de L.C.R.
54	0,72	70	2,73	86	0,66
55	0,96	71	0,76	87	0,75
56	0,91	72	0,81	88	0,85
57	1,06	73	0,81	89	1,93
58	0,56	74	0,83	90	0,72
59	0,53	75	2,35	91	0,61
60	0,51	76	2,32	92	0,71
61	1,30	77	1,71	93	0,71
62	0,50	78	1,87	94	0,58
63	0,51	79	2,64	95	0,88
64	0,71	80	3,71	96	0,70
65	0,81	81	2,48	97	2,32
66	0,90	82	3,18	98	1,71
67	0,76	83	2,22	99	2,73
68	3,15	84	2,54	100	0,71
69	0,62	85	0,70		

D) **Justification de la méthode.**

Pour contrôler les résultats obtenus par la méthode colorimétrique de LOWRY et ses collaborateurs, nous avons titré l'azote protéique de 15 liquides céphalo-rachidiens (ou mélanges de liquides céphalo-rachidiens), d'une part, au moyen de la méthode de référence (c'est-à-dire le microkjeldahl après élimination de l'azote non protéique selon la technique que nous avons exposée dans les pages précédentes), et, d'autre part, en utilisant la méthode colorimétrique envisagée. Après transformation des résultats en protéines, nous avons pu dresser le tableau n° VI.

TABLEAU VI.

Etude comparée entre les protidorachies exprimées en grammes de protéines par litre de liquide céphalo-rachidien, déterminées d'une part par le microkjeldahl, d'autre part, selon la méthode de LOWRY.

N° de l'échantillon	Microkjeldahl (a)	Colorimétrie (b)	Ecarts (a — b) en % de a
1	0,49	0,49	0
2	0,44	0,43	— 2,20
3	1,14	1,06	— 7
4	1,32	1,30	— 1,50
5	0,58	0,57	— 1,70
6	0,61	0,60	— 1,66
7	0,81	0,81	0
8	1,96	1,94	— 1
9	0,89	0,89	0
10	0,72	0,71	— 1,40
11	0,79	0,79	0
12	2,66	2,54	— 4,40
13	0,71	0,71	0
14	1,01	1,01	0
15	3,12	3,15	+ 1
		Ecart moyen :	— 1,46 %

La comparaison des résultats contenus dans le tableau VI permet de constater un accord satisfaisant entre les valeurs de la protéinorachie déterminée sur un même liquide céphalo-rachidien par l'une et l'autre des méthodes mises en œuvre. En effet l'écart

moyen entre les deux séries de protéinorachies est de ± 1,46 pour 100, et nous voyons que l'écart sur un dosage est rarement supérieur à 2 p. 100.

En résumé l'examen de nos résultats montre que la technique que nous avons étudiée donne une excellente approximation et présente donc des avantages certains sur les autres procédés.

DEUXIÈME PARTIE

MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE DE DOSAGE DE L'AZOTE PROTÉIQUE BASÉE SUR LA FORMATION D'AZOPROTÉINES.

Comme nous l'avons déjà signalé, la réaction colorée de PAULY est fondée sur la copulation en milieu alcalin de certains diazoïques avec les protéines, ou plus exactement avec certains acides aminés (tyrosine, histidine...) contenus dans les protéines.

Nos recherches ont eu pour but d'appliquer cette réaction entre diazoïques et amino-acides au dosage colorimétrique de l'azote protéique.

Nous avons d'abord essayé d'utiliser l'acide paradiazo-benzène sulfonique préconisé par PAULY. Mais nous nous sommes aperçus que l'intensité de la coloration augmente sans cesse aussi bien dans l'essai que dans le témoin, ce que nous pouvons expliquer de la manière suivante : le radical qui supporte le groupement diazoïque n'est pas suffisamment électro-négatif, et comme l'acide para-diazo-benzène sulfonique est en excès dans le milieu il se produit des réactions secondaires. Ainsi, l'acide para-diazo-benzène-sulfonique se décompose à la température du laboratoire ; il y a libération d'azote et formation d'acide paraphénol-sulfonique conformément à la réaction :

$$SO_3H - C_6H_4 - N = N - OH \longrightarrow N_2 + SO_3H - C_6H_4 - OH$$

Le diazoïque restant dans le milieu réagit alors sur cet acide para-phénol-sulfonique pour donner un nouveau composé azoïque coloré, selon la réaction :

$$SO_3H - C_6H_4 - N = N - OH + SO_3H - C_6H_4 - OH \longrightarrow$$

$$\longrightarrow SO_3H - C_6H_4 - N = N - C_6H_3 \begin{matrix} OH \\ SO_3H \end{matrix} + H_2O$$

L'intensité de la coloration augmente donc sans cesse jusqu'à épuisement du diazoïque, par formation de ce dérivé coloré.

Nous avons pensé qu'il serait possible de pallier cet inconvénient en augmentant le caractère électronégatif du radical ceci ayant pour effet de stabiliser les diazoïques. Pour cela nous avons songé à nous servir du diazoïque de la tribromo-aniline, auquel les trois atomes de brome confèrent une grande stabilité.

Nous allons tout d'abord en étudier le mode d'obtention qui comporte la préparation de la tribromo-aniline puis la diazotation de celle-ci.

Préparation de la tribromo-aniline.

On transforme l'aniline pure, insoluble dans l'eau, en chlorhydrate d'aniline soluble : pour cela, on introduit dans un ballon environ 500 ml. d'eau distillée, 23 ml. d'acide chlorhydrique concentré et 3 ml. d'aniline. On soumet à une agitation mécanique. On ajoute alors 21 gr. de bromure de potassium et l'on attend que la dissolution soit complète.

Par ailleurs, on dissout 6 gr. de bromate de potassium dans le minimum d'eau distillée possible. Toujours en agitant, on ajoute cette solution à la première, en la faisant tomber goutte à goutte, au moyen d'une ampoule à décantation. En présence de l'acide chlorhydrique qui est en excès dans le milieu, le bromure et le bromate réagissent pour libérer du brome conformément à la réaction :

$$BrO_3K + 5\ Br\ K + 6\ HCl \longrightarrow 3\ Br_2 + 3H_2O + 6\ KCl$$

Le brome libéré réagit sur l'aniline pour former un précipité blanc de tribromo-aniline. On isole ce précipité et on le lave plusieurs fois à l'eau distillée. On le sèche à l'étuve. En flacon bien bouché, ce corps se conserve parfaitement.

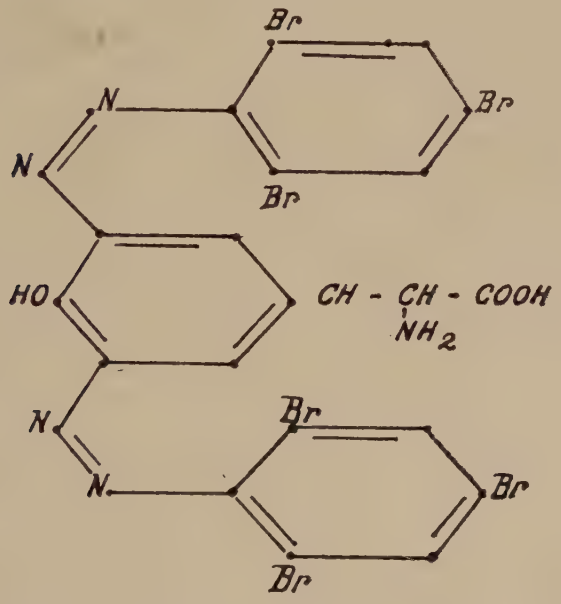
Préparation du réactif au diazotribromobenzène.

Dans un tube à essai propre et sec, on introduit 200 mg. de tribromo-aniline et 2 ml. d'acide sulfurique concentré et pur. On broie avec un agitateur jusqu'à complète dissolution. On ajoute alors 0,5 ml. d'eau distillée. On agite et on laisse refroidir. Par ailleurs, dans un deuxième tube à essai propre et sec on dissout 50 mg. de nitrite de sodium dans 2 ml. d'acide sulfurique concentré et pur, que l'on ne doit pas ajouter goutte à goutte, mais rapidement pour

éviter le dégagement de vapeurs nitreuses. On mélange alors les deux solutions en transvasant plusieurs fois le contenu des tubes l'un dans l'autre. Enfin, on jette le produit de la réaction dans une fiole contenant 60 ml. environ d'eau distillée glacée, en prenant la précaution d'égoutter les deux tubes. On agite, on filtre et on porte à 100 ml. avec de l'eau glacée. Ce réactif doit être préparé extemporanément et conservé à une température de 0°c à 5°c. Il n'est stable que pendant quelques heures. Il est constitué par une solution de diazotribromobenzène en milieu acide sulfurique dilué.

Principe de la réaction.

Si l'on fait agir à froid et en milieu alcalinisé par le carbonate de potassium le diazotribromobenzène sur une solution pure de tyrosine, il se développe une coloration jaune due à la formation de l'azoïque répondant à la formule ci-dessous :



Au bain-marie bouillant la teinte vire au rose vif, ce phénomène complexe est difficile à expliquer : on peut cependant supposer qu'il y a élimination de deux molécules d'acide bromhydrique et formation d'un nouveau dérivé azoïque coloré. Il n'est pas exclu de supposer que ce nouveau dérivé puisse passer sous la forme quinonique pour donner une coloration plus intense.

Si dans les mêmes conditions on remplace la tyrosine par de l'histidine, il se développe à froid une coloration jaune que le chauf-

fage ne modifie pas. Avec le tryptophane la teinte qui est jaune à froid vire au rose très pâle après chauffage. Donc la coloration rose intense résultant de la réaction décrite ci-dessus peut être considérée comme spécifique de la tyrosine.

Cette réaction nous a paru assez sensible pour justifier une étude plus précise, dans le but de rechercher les conditions permettant de la mettre en œuvre, dans le domaine de l'analyse quantitative. C'est ainsi que nous avons été incidemment amenés à étudier la mise au point d'un dosage colorimétrique de la tyrosine en *solution pure* fondé sur la réaction de copulation de cet acide aminé aromatique avec le diazotribromobenzène.

Au cours des essais préliminaires dont la relation serait assez fastidieuse nous avons pu fixer quelles sont les meilleures conditions opératoires. Nous avons étudié l'influence

1° du volume du réactif au diazotribromobenzène,

2° du temps de contact à froid nécessaire à la copulation,

3° du degré d'alcalinité le plus favorable,

4° du temps de chauffage au bain-marie bouillant.

En effet l'intensité de la coloration rose semble augmenter jusqu'à la 35e minute. Voici à titre d'exemple quelques résultats obtenus au cours de l'une de nos expériences.

TABLEAU VII.

Influence de la durée de chauffage.

Durée en minutes du temps de chauffage au bain-marie	10	15	20	25	30	35	40	45
Graduations du spectrophotomètre.....	51,5	52	55	61	62	67	67	67

L'ensemble de ces essais, ainsi que la détermination du spectre d'absorption dans le visible (voir figure IV) nous ont conduits à adopter la technique décrite ci-dessous :

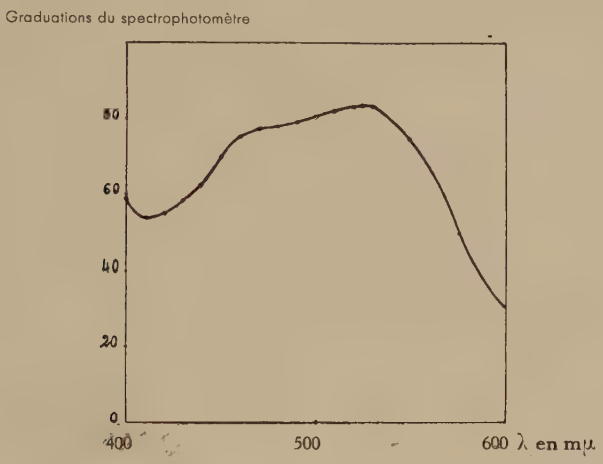


Fig. IV. — Spectre d'absorption des produits de la réaction au diazotribromobenzène sur la tyrosine pure et sur les protéines sériques.

Dosage de la tyrosine en solution pure.

Solution de tyrosine : on pèse environ exactement 4 mgr. de tyrosine pure que l'on dissout dans q.s.p. 100 ml. d'eau distillée très légèrement acidifiée par de l'acide chlorhydrique. Cette solution contient donc environ 40 μg de tyrosine par ml.

Mode opératoire : Dans un tube à essai propre, sec et jaugé à 10 ml., on introduit une prise d'essai contenant de 40 à 160 μg de tyrosine. On porte le volume de la prise d'essai à 5 ml. avec de l'eau distillée. On ajoute 1 ml. de réactif au diazotribromobenzène, on agite et on attend 5 minutes. On complète à 10 ml. avec une solution à 20 p. 100 de carbonate de potassium. On agite et on porte le tube au bain-marie bouillant pendant 35 minutes. Pour éviter l'évaporation on obture l'orifice du tube avec une petite ampoule de verre. Il se développe une coloration rose. On refroidit le tube sous un courant d'eau. Un essai témoin est préparé de façon identique en remplaçant la solution de tyrosine par de l'eau distillée. On lit l'intensité de la coloration au spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 525$ mμ et en cuves de 2 cm.

Voici, à titre d'exemple, les résultats obtenus au cours d'un essai que l'on peut considérer comme correspondant à l'établissement

d'une courbe d'étalonnage entre les limites de 30 à 150 µg de tyrosine.

TABLEAU VIII.

Etalonnage du dosage colorimétrique de la tyrosine par notre méthode.

Tyrosine mise en œuvre en µg dans la prise d'essai	30	60	90	120	150
Graduations du spectrophotomètre	5	26	45	62,5	83

On obtiendra le graphique de la courbe d'étalonnage en portant en abscisse le nombre des graduations du spectrophotomètre et en ordonnée les quantités correspondantes de tyrosine mises en œuvre dans les prises d'essai. On constate que le graphique obtenu est une droite (fig. V).

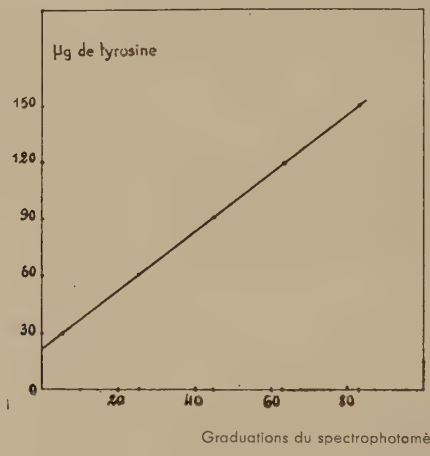


Fig. V. — Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique de la tyrosine par notre méthode.

Nous devons signaler ici que si l'on veut obtenir des résultats très précis, il est bon de réaliser un nouvel étalonnage chaque fois que l'on utilise un nouveau réactif au diazotribromobenzène. Toutefois pour les dosages courants on pourra utiliser la courbe d'étalonnage type de la figure V sans qu'il en résulte des erreurs de plus de 4 à 5 p. 100.

Les dosages que nous avons effectués sur des solutions dont la concentration en tyrosine était connue nous ont montré que notre

méthode colorimétrique permet d'obtenir des résultats avec une précision de 2 p. 100.

Nous pouvons donc conclure que la technique que nous venons de décrire permet de doser colorimétriquement la tyrosine avec une précision de l'ordre de ± 2 p. 100 et que sa marge d'utilisation s'étend de 0,040 à 0,160 mg. lorsque cet acide aminé est mis en œuvre en solution pure. Notre méthode est donc plus sensible que celle de MILLON adoptée par LUGG [**41**] qui s'adresse à des prises d'essai contenant de 0,25 à 1 mg. de tyrosine.

Nous avons essayé d'appliquer notre méthode colorimétrique au dosage de la tyrosine dans les hydrolysats protéiques. Mais dans ces conditions, le dosage s'est avéré impossible par suite de la présence des autres acides aminés. Il faudrait réaliser une séparation de la tyrosine, ce qui sort du cadre de nos recherches.

Nous avons alors songé à utiliser notre technique personnelle en vue du dosage de l'azote protéique des sérums et nous avons mis au point la méthode suivante :

Dosage colorimétrique de l'azote protéique du sérum sanguin par le réactif au diazotribromobenzène :

1. RÉACTIFS UTILISÉS.

1. — Réactif au diazotribromobenzène.

2. — Solution alcaline :

carbonate de potassium anhydre ...		20 gr.
eau distillée.....	q.s.p.	100 ml.

2. *Mode opératoire :*

On introduit dans un tube à essai en verre pyrex jaugé à 10 ml. un volume de dilution du sérum dans l'eau physiologique égal au plus à 5 ml. et contenant de 100 à 300 µg d'azote protéique. Si besoin est, on complète à 5 ml. avec de l'eau distillée. Les opérations sont alors conduites comme pour le dosage de la tyrosine en solution pure, selon notre technique personnelle que nous avons décrite précédemment.

3. *Etalonnage de la méthode.*

Pour pouvoir tracer une courbe d'étalonnage, on dosera l'azote protéique d'un sérum donné par le microkjeldahl selon le mode opératoire que nous avons déjà décrit. Ensuite, connaissant la teneur

en azote protéique de l'échantillon, on dosera colorimétriquement avec le réactif au diazotribromobenzène diverses dilutions de cet échantillon.

Nous donnerons ici, à titre d'exemple, les résultats qui nous ont servi à établir la courbe d'étalonnage dont le graphique est représenté dans la fig VI et que nous utiliserons par la suite pour le dosage de l'azote protéique de différents sérums par notre méthode colorimétrique.

Nous avons d'abord dosé par le microkjeldahl l'azote protéique du sérum que nous avons utilisé pour cet étalonnage : le sérum contenait 11,2 mg. d'azote protéique par ml.

Ensuite, avec le même échantillon de sérum nous avons fait une dilution au 1/100 dans l'eau physiologique, et nous avons effectué notre dosage colorimétrique sur différentes prises d'essai de cette dilution. Les résultats de ces essais sont contenus dans le tableau IX.

TABLEAU IX.

Etalonnage du dosage colorimétrique de l'azote protéique d'un sérum.

Volume de la prise d'essai du sérum dilué au 1/100e en ml.	Quantités d'azote protéique correspondantes en µg	Graduations du spectrophotomètre
0,5	56	19
1	112	35,5
1,5	168	50
2	224	62
1,5	280	72,5

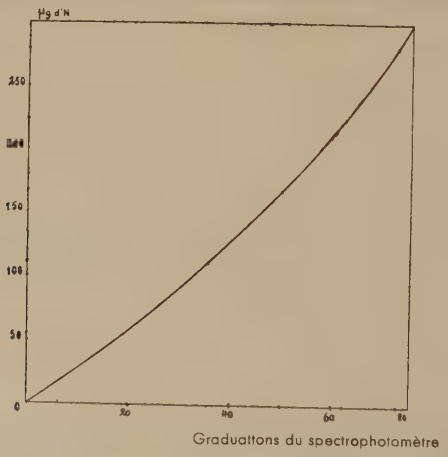


Fig. VI. — Courbe d'étalonnage du dosage colorimétrique de l'N protéique par la méthode colorimétrique en diazotribonobenzène.

Pour parachever l'étude de notre technique, nous nous sommes proposés, comme nous l'avons laissé prévoir, de vérifier que le dosage reste possible, même si le milieu contient une assez forte proportion de sels.

Pour cela, nous avons utilisé un sérum contenant 11,5 gr. d'azote protéique par litre, que nous avons dilué au 1/200e par de l'eau physiologique.

Nos dosages ont été effectués sur des prises d'essai fixes de 3 ml. de cette dilution de sérum auxquelles nous avons ajouté des quantités croissantes d'une solution de phosphates 3,5 M contenant 238 gr. de phosphate monopotassique et 304,5 gr. de phosphate dipotassique par litre. Cette solution très concentrée en phosphates est celle que l'on utilise pour l'étude des mélanges protéiques par la méthode de relargage (Y. Derrien [**13**]). Nous avons groupé nos résultats dans le tableau suivant :

TABLEAU X

Influence de la concentration en sels.

N° des tubes	Prise d'essai de sérum dilué au 1/200	H_2O en ml.	Solution 3,5 M de phosphates en ml.	Solution 3,5 M de phosphates en % dans la prise d'essai	Graduations du spectrophotomètre
1	3	2	0	0	51
2	3	1,6	0,4	8	60
3	3	1,5	0,5	10	60,5
4	3	1,4	0,6	12	61
5	3	1,3	0,7	14	61,5
6	3	1,2	0,8	16	63
7	3	1,1	0,9	18	66,5
8	3	1,0	1,0	20	67,5
T.	0	5	0	0	

De l'examen du tableau X, il ressort que la présence de phosphates dans le milieu augmente nettement l'intensité de la coloration.

Toutefois elle ne nuit pas à l'exécution du dosage car le milieu reste parfaitement limpide.

Dans le cas où la solution à doser contient une assez forte proportion de sels, il conviendra donc d'établir une nouvelle courbe d'étalonnage en présence de sels, ce qui permettra de pouvoir effectuer les dosages avec une excellente approximation.

Nous nous proposons maintenant de faire une étude comparée des résultats obtenus lors de la détermination de l'azote protéique du sérum sanguin par le microkjeldahl et les méthodes colorimétriques utilisant l'acide phosphotungstomolybdique, le diazotribromobenzène et la réaction du biuret.

ÉTUDE COMPARÉE DES RÉSULTATS OBTENUS LORS DE LA DÉTERMINATION DE L'AZOTE PROTÉIQUE DU SÉRUM SANGUIN PAR LE MICROKJELDAHL ET LES MÉTHODES COLORIMÉTRIQUES UTILISANT L'ACIDE PHOSPHOTUNGSTOMOLYBDIQUE, LE DIAZOTRIBROMOBENZÈNE ET LA RÉACTION DU BIURET.

Cette étude a pour but d'apprécier la valeur des résultats fournis par notre méthode.

Nous avons dosé l'azote protéique d'un même sérum sanguin, au moyen :

1° du microkjeldahl : en suivant le mode opératoire, exposé dans les pages précédentes, sur des prises d'essai de 10 ml. de dilution au 1/100 de sérum dans l'eau physiologique. Rappelons qu'il s'agit là de la méthode de référence.

2° du réactif de Folin et Ciocalteu d'après la technique de Lowry et ses collaborateurs, en nous adressant à des prises d'essai de 0,3 ml. de sérum dilué au 1/100^{e} par de l'eau physiologique,

3° du réactif au diazotribromobenzène en appliquant notre méthode sur des prises d'essai de 1,5 ml de dilution au 1/100^{e} de sérum dans l'eau physiologique,

4° de la réaction du biuret : en adoptant la technique préconisée par JAYLE, BOUSSIER et BADIN [**32**] que nous avons exposée dans notre introduction et qui met en œuvre des prises d'essai de 1 ml. de sérum dilué au 1/10 par de l'eau physiologique.

Nos essais ont porté sur 20 sérums différents.

Les résultats que nous avons obtenus par les différentes méthodes que nous venons de citer ont été groupés dans le tableau n° XI.

TABLEAU XI.

Etude comparée entre les déterminations de l'azote protéique (en g. d'azote par litre) d'un même sang par le microkjeldahl et les méthodes à l'acide phosphotungstomolybdique, au diazotribromobenzène et du biuret.

N° de l'échantillon	Microkjeldahl	Méthode de Lowry	Méthode personnelle	Biuret
1	9,40	9,30	9,20	9,20
2	12,60	12,50	12,30	12,30
3	10,30	10,30	10,50	10,30
4	11,90	11,70	11,60	11,60
5	10,45	10,20	10,20	10,10
6	10,90	10,80	10,90	10,80
7	9,75	9,60	9,90	9,80
8	12,50	12,30	12,60	12,70
9	10,95	10,80	10,70	11
10	10,10	10	10	10,20
11	10,66	10,50	10,60	10,60
12	11,20	11,20	11,20	11
13	11,30	11,20	11,30	11,10
14	11,20	11	11,30	11,50
15	12,20	12	12,50	12,40
16	12	12,10	12	11,90
17	11,50	11,50	11,60	11,70
18	12,30	12,10	12,40	12,50
19	10,75	10,90	10,50	10,90
20	10,25	10,10	10,20	10,20

En accordant une attention toute particulière à l'examen du tableau XI, nous voyons qu'il existe un accord très satisfaisant entre les déterminations de l'azote protéique d'un même sérum par la méthode de référence, la méthode que nous avons mise au point et les autres méthodes colorimétriques.

Les résultats sont obtenus avec un écart sensiblement le même, qui est en moyenne de 1 à 1,50 p. 100. C'est donc la sensibilité des différentes méthodes qui les départagera. Nous devrons ainsi reconnaître la supériorité de la méthode de Lowry qui s'adresse à des prises d'essai contenant de 0,010 à 0,040 mg. d'azote protéique. Celle du biuret permet de doser de 0,50 à 1,5 mg. d'azote protéique ;

elle est donc nettement moins sensible que la précédente. Nous rappellerons ici que ces deux techniques sont impraticables en présence des quantités élevées de sels neutres. Notre méthode dont la marge d'utilisation s'étend de 0,10 à 0,30 mg. d'azote protéique est donc environ dix fois moins sensible que celle de Lowry. Son principal avantage réside dans le fait qu'elle est applicable même dans le cas où les solutions sont d'une assez forte concentration en sels, si l'on respecte les conditions opératoires signalées p. 56.

CONCLUSIONS

Pendant notre séjour au laboratoire de chimie nous avons effectué un travail de biochimie analytique concernant le microdosage colorimétrique des protéines. Il convient maintenant de dégager les principales conclusions auxquelles nos recherches nous ont conduits. Ces considérations seront très brèves car elles portent sur des faits précis d'ordre technique, dont nous pouvons souhaiter que les applications ultérieures permettent des développements plus étendus.

Dans notre introduction, nous avons tenté de présenter une étude critique des différentes méthodes colorimétriques de dosage des protéines proposées antérieurement à notre travail. Rappelons que celles-ci consistent en des applications de certaines des réactions colorées qui avaient été antérieurement utilisées pour caractériser les protéines. La documentation que nous avons recueillie nous a permis de mettre en évidence que la plus sensible et la plus précise des techniques proposées consiste en la colorimétrie de la teinte bleue qui se développe lorsqu'on traite une solution diluée de protéines, en présence de traces de cuivre et en milieu alcalin par un réactif phosphotungstomolybdique. Comme nous l'avons vu, nous nous sommes surtout attachés à l'étude de cette méthode, ce qui ne signifie pas que les autres ne présentent pas, en certains cas, des avantages particuliers. Tel est le cas de la méthode fondée sur la réaction du biuret qui conserve la faveur de nombreux analystes en raison de sa très grande facilité d'exécution.

Lorsque nous avons entrepris nos recherches, nous avons été séduits par la méthode de Lowry et ses collaborateurs (au phosphotungstomolybdate) et les résultats publiés par ces auteurs nous ont incités à appliquer leur technique au dosage des protéines du liquide céphalo-rachidien.

En effet, les techniques utilisées dans ce but par une très grande majorité des laboratoires d'analyses médicales (opacimétrie, stéréovolumétrie) ne conduisent en fait qu'à des résultats très approximatifs. P. Morand et J. Dufau-Casanabe ont d'ailleurs définitivement tranché cette question dans le même sens au cours de leur récente étude qui a apporté des preuves irréfutables de l'incorrection

de telles techniques. Mais alors que nos recherches étaient en cours, nous avons pris connaissance d'un travail par lequel DAUGHADAY, LOWRY et leurs collaborateurs ont étendu leur méthode à la détermination de la protidorachie. Nous n'avons pas pour autant abandonné notre travail et cela pour les raisons suivantes. Tout d'abord nous avons noté que DAUGHADAY, LOWRY et leurs collaborateurs n'avaient pas comparé leurs résultats avec une méthode de référence, ce que nous avions entrepris de faire. Par ailleurs, il nous a paru utile de souligner la valeur de leur technique afin d'en permettre une diffusion aussi large que possible.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ces recherches ont mis en évidence que l'emploi du réactif phosphotungstomolybdique mis en œuvre dans les conditions préconisées par les promoteurs de la méthode permet de déterminer la protidorachie avec une excellente précision. La comparaison que nous avons effectuée avec la méthode de kjeldahl, choisie comme méthode de référence montre que la technique de ces auteurs conduit à des résultats qui sont bien l'expression de la teneur exacte en protéines du liquide céphalo-rachidien. Ce contrôle fondamental nous permet de préconiser cette méthode précise de la protidorachie. En effet, dans certains cas, il est particulièrement important de connaître la teneur exacte en protéines du liquide céphalo-rachidien à différents étages du canal médullaire ; tel est le cas qui se présente lorsque le médecin praticien soupçonne l'existence d'un obstacle à la diffusion du liquide cérébro-spinal. On conçoit que seules les déterminations précises permettent alors d'étayer un diagnostic. Enfin, les laboratoires d'analyses médicales disposant ainsi d'une technique fidèle, précise et d'une grande simplicité d'exécution, devraient se faire un devoir d'abandonner en sa faveur des méthodes reconnues par ailleurs défectueuses et de ce fait dénuées d'intérêt. Telles sont les conclusions de la première partie de notre travail.

Comme nous l'avons vu dans notre introduction, toutes les réactions colorées caractéristiques des protéines n'ont pas fait l'objet d'une application quantitative ; tel est le cas de la réaction de copulation des protéines avec certains diazoïques. On sait que l'acide paradiazobenzène-sulfonique réagit avec les aminoacides phénoliques (tyrosine) et hétérocycliques (histidine) inclus dans les protéines, pour donner lieu au développement d'une coloration jaune (GRIESS et PAULY). Nous avons tout d'abord songé à rechercher si cette réaction était susceptible d'être transposée sur le plan quantitatif. Nous nous sommes rapidement rendus compte que cela était impossible et nous en avons donné les raisons ; l'écueil que nous avons rencontré est dû à l'instabilité de l'acide paradiazobenzènesulfonique utilisé. Il nous a donc paru logique de tenter de substituer à ce dernier un diazoïque beaucoup plus stable. Pour cela nous avons fait

appel au diazotribromobenzène dont la stabilité est assurée par la présence de trois atomes de brome qui exaltent le caractère électronégatif du noyau aromatique.

Dans notre travail nous avons décrit en détail la préparation de la tribromoaniline nécessaire à la préparation du réactif à base de diazotribromobenzène. Le principe de notre technique consiste alors à traiter la protéine par le réactif diazotribromobenzénique en milieu alcalin. Nous avons observé qu'il se développe à froid une coloration jaune. Mais nous avons remarqué que le chauffage provoque l'apparition d'une coloration rose beaucoup plus intense. Nous avons montré que cette coloration est due au reste de tyrosine : en effet si dans les mêmes conditions on traite une solution de tyrosine par notre réactif à base de diazotribromobenzène en milieu alcalin et que l'on chauffe au bain-marie bouillant, la même coloration rose vif prend naissance, alors que les solutions d'histidine demeurent seulement colorées en jaune et que celles du tryptophane se teintent en rose très pâle.

Incidemment, nous avons décrit les conditions opératoires qui permettent le dosage colorimétrique de la tyrosine en solution pure au moyen de notre réactif. Les difficultés rencontrées en ce qui concerne les tentatives d'application de cette technique au dosage de la tyrosine dans les hydrolysats protéiques nous ont conduits à un échec. En effet l'ensemble des acides aminés autres que la tyrosine consomment une grande proportion de diazotribromobenzène et il se produit une coloration noirâtre. Le dosage de la tyrosine dans les hydrolysats protéiques implique donc une séparation préalable de cet acide aminé.

Cependant les protéines intactes avec le diazotribromobenzène donnent lieu à la formation d'azoprotéines de coloration rose. Nous nous sommes attachés à déterminer les conditions opératoires qui permettent d'utiliser cette réaction dans le cadre de la chimie analytique quantitative. Ces recherches nous ont amenés à la mise au point d'une microméthode colorimétrique de dosage des protéines du sérum sanguin. Cette méthode est décrite en détail dans la partie expérimentale de notre travail. Nous en avons comparé les résultats avec ceux obtenus sur un même sérum au moyen de la méthode de kjeldahl choisie comme méthode de référence, avec la méthode à l'acide phosphotungstomolybdique et celle du biuret.

Par ailleurs nous avons tenu à étudier l'influence d'une concentration saline élevée sur les résultats de notre technique. Contrairement à ce qui a lieu quand on utilise la méthode de Lowry et ses collaborateurs, ou celle du biuret, qui deviennent impraticables dans les solutions salines concentrées, notre technique est susceptible de conduire encore à des résultats corrects dans des conditions

semblables. Il suffit pour cela d'établir les courbes d'étalonnage en présence d'une quantité de sels grossièrement comparable à celle présente dans l'essai proprement dit. Ainsi, un des avantages de notre technique consiste en la possibilité de son application au dosage des protéines que comporte l'étude du fractionnement de ces corps par la méthode de relargage.

Précisons que la marge d'utilisation s'étend de 0,10 à 0,30 mg. d'azote protéique. En ce qui concerne le sérum sanguin, cela permet de déterminer la protidémie sur une prise d'essai correspondant à un à deux centièmes de millilitre.

La précision de notre technique est de l'ordre de 1 à 2 p. 100. Elle permet de réaliser de grandes séries de dosages.

Parmi ses inconvénients il y a lieu d'indiquer que lorsqu'on désire obtenir le maximum de précision, il convient de reproduire la courbe d'étalonnage lors de chaque série de dosage, c'est-à-dire chaque fois que l'on prépare un nouveau réactif à base de diazotribromobenzène. Cependant dans la plupart des cas, cette précaution s'avère inutile. Enfin les résultats obtenus par notre technique sont bien l'expression de la teneur en protéines comme le démontre l'accord qui existe entre eux et ceux obtenus par la méthode de référence (microkjeldahl).

La comparaison des résultats contenus dans le tableau n° XI p. 58 permet de situer notre technique dans la gamme de la plupart des autres techniques antérieurement proposées. C'est ainsi que notre méthode apparaît comme moins sensible que celle de Lowry et ses collaborateurs ; en effet, sa mise en œuvre exige une prise d'essai comprise entre 100 et 300 µg d'azote protéique alors que la méthode phosphotungstomolybdique permet d'opérer entre 10 et 40 µg. Notre technique est donc environ 10 fois moins sensible que celle des auteurs américains. Par contre, on peut la considérer comme 5 à 10 fois plus sensible que celle du biuret qui nécessite des prises d'essai de l'ordre du mg. d'azote protéique pour conduire à des résultats vraiment précis.

En résumé, les résultats acquis au cours de notre travail sont les suivants :

1° Nous avons mis en évidence l'incontestable supériorité de la détermination de la protidorachie selon la méthode de Lowry et ses collaborateurs, méthode dont nous ne saurions trop préconiser l'emploi ;

2° Nous proposons une nouvelle méthode colorimétrique pour le microdosage de l'azote protéique du sérum sanguin, dont nous avons décrit les principaux avantages. A notre sens, ces avantages

sont tels que notre méthode mérite de prendre rang parmi les techniques antérieurement proposées et qu'elle est susceptible d'être étendue au dosage des protéines dans des milieux autres que le sérum sanguin ;

3° Nous avons décrit une nouvelle microméthode colorimétrique de dosage de la tyrosine en solution pure, pouvant servir de base à l'élaboration d'une méthode de dosage de cet acide aminé dans les hydrolysats protéiques. Une telle application implique la séparation préalable de la tyrosine.

Vu, le Président du Jury,
Professeur C. DUMAZERT.

Vu et approuvé,
pour le doyen, l'Assesseur,
Professeur J. DELPHAUT.

Vu et permis d'imprimer,
Aix, le 2 Juin 1955.
Le Recteur BLACHE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Andersch (M.) and Gibson (R.B.). — *J. Lab. and Clin. Med.*, 1933, **18**, 816.

2. Benedict (S.R.). — A note on the preparation of glyoxylic acid as a reagent. — *J. Biol. Chem.*, 1909, **6**, 51-52.

3. Bernhart (F.W.). — Microdetermination of the tyrosine content of protein hydrolysates, *Proc. Am. Soc. Biol. Chem.*, *J. Biol. Chem.*, 1938, **10**, 123.

4. Block (R.J.) et Bolling (D.). — The amino acid composition of proteins and foods., 1951, Charles C. Thomas publisher Springfield. Illinois U.S.A.

5. Borsook (H.). — Micromethods for determination of ammonia urea, total nitrogen, uric acid, creatinine (and creatine) and allantoïn. *Journ. of biol. Chem.*, 1835, **110**, 481-493.

6. Brice (A.T.). — The tryptophan content of blood serum ; A new technic *J. Lab. Clin. Med.*, 1933-1934, **19**, 1113-1115.

7. Cary (C.A.). — The use of the Hopkins. Cole glyoxylic acid reagent for the quantitative determination of free tryptophan in blood. *J. Biol. Chem.*, 1926, **67**, 39.

8. Conway (T.) and Byrne (A.). — The microdetermination of ammonia. *Biochem. Journ.*, 1933, **27**, 419-429.

9. Crismer (M.R.). — Dosage photométrique de l'ammoniaque au moyen d'un réactif nouveau. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1937, **19**, 1.000.

10. Danet et Laisné. — *Ann. Bio. Clin.*, Janvier-Février 1948, **38**.

11. Daughaday (W.H.), Lowry (O.H.), Rosebrough (N.J.) and Fields (W.S.). — Determination of cerebrospinal fluid protein with the Folin phenol reagent. *J. Lab. and Clin. Med.*, 1952, **39**, 663.

12. Delsal (J.L.). — Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal. Applications au microdosage du cholestérol total des phosphoaminolipides et des protéides. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1944, **26**, 99.

13. Derrien (Y.), Steyn-Parvé (E.), Cotte (M.) and Laurent (G.). — Studies on proteins by means of salting out curves. *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, **9**, 49.

14. Dognon (A.). — Colorimétrie en milieu trouble. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 113.

15. Dognon (A.). — *Dognon in techn. de lab.* (Loiseleur), p. 205-206.

16. Dos Reis. — *Ann. Biol. Clin.*, Janv.-Fév. 1948, p. 19.

17. Dumazert (C.). — Sub-microdosage de l'azote dans la matière organique par la méthode de Kjeldahl. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 1405.

18. Dumazert (C.) et Grangaud (R.). — Microdosage colorimétrique du tryptophane dans les protéines et dans les peptones. *Travaux Soc. Pharm. Montpellier*, 1954, XIV, III, **146**.

19. Dumazert (C.) et Marcelet (Y.). — Sur un nouveau catalyseur de minéralisation sulfurique des corps organiques en vue du dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1938, **20**, 201.

20. Dumazert (C.) et Poggi (R.). — Sur le microdosage colorimétrique de l'arginine et de divers dérivés guanidiques monosubstitués. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, **21**, 1381.

21. Dustin (J.P.). — Du dosage des protéines au moyen de la réaction du biuret. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, **32**, 696.

22. Fine (J.). — The biuret method of estimating albumin and globulin in serum and urine. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 799.

23. Fleury (P.), Courtois (J.) et Mlle Eberhard (R.). — Dosage pondéral des protéines sériques ; Etude critique et nouvelle technique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 1900.

24. Fleury (P.), Mlle Eberhard (R.). — Recherches sur le dosage des protéines par la méthode photométrique au biuret selon la technique de Gornall. *Ann. Biol. Clin.*, 1951, **9**, 453.

25. Folin (O.) et Ciocalteu (V.). — On tyrosin and tryptophan determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, 1927, **73**, 627-649.

26. Fujita (A.). et Iwatake (D.). — Bestimmung des echten Blutgucker ohne Hefe. *Biochem., Ztschr.*, 1931, **243**, 43.

27. Gornall (A.G.), Baradwill (C.J.) and David (M.M.). — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 751.

28. Greenberg (D.M.) et Mirolubova (T.N.). *J. Lab. and Clin. Med.*, 1936. **21**, 431.

29. Herbain (M.). — Sur l'adaptation microanalytique de la réaction de Nessler. Application aux milieux biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, **35**, 1031.

30. Hoffmann (R.). — Reaction auf leucin und tyrosin. *Liebig's Ann.*, 1853 **87**, 123-125.

31. Hopkins (F.G.) and Cole (S.W.). — On the proteid reaction of Adamkiewicz, with contributions to the chemistry of glyoxylic acid. *Prog. Roy. Soc.*, London, 1901, **68**, 21-33.

32. Jayle (M.F.), Boussier (G.) et Badin (J.). — Microdosage des protéines sériques par la méthode du biuret. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **33**, 881.

33. Jean (G.). — Sur les microdosages colorimétriques de l'arginine en solution pure et dans les hydrosylats protéiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, **16**, 307.

34. Jorpes (E.). — The protein component of the erythrocyte membrane or stroma. *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1507-1511.

35. Jorpes (E.) and Thoren (S.). — The use of the Sakaguchi reaction for the quantitative determination of arginine. *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1504-1506.

36. Kaiser (F.). — Dosage rapide des protéines dans le sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 533.

37. Kingsley (G.R.). — *J. Biol. Chem.*, 1912, **27**, 840.

38. Koessler (K.K.) et Hanke (M.T.). — Studies on proteinogenous amines. A micro chemical colorimetric method for estimating imidazole derivatives. *J. Biol. Chem.*, 1919, **39**, 497-519.

39. Lang (K.). — Eine mikromethode zur bestimmung des histidins insbesondere ein verfahren zur trennung von histidin und tyrosin. *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1933, **222**, 3-5.

40. Lowry (O.H.), Rosebrough (N.J.), Farr (A.L.) and Randall (R.J.). — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265.

41. Lugg (J.W.H.). — On the use of mercuric salts and nitrous acid in the colorimetric determination of tyrosin and tryptophan present in solution. *Biochem. J.*, 1937, **31**, 1423-1433.

42. Machebœuf (M.), Lacaille (P.) et Rebeyrotte (P.). — Recherches sur la réaction xanthoprotéique. Application pour le microdosage colorimétrique des protéines du sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 402.

43. Macpherson (H.T.). — The basic amino-acid content of proteins. *Biochem. J.*, 1946, **40**, 470-481.

44. Millon (M.E.). — Sur un réactif propre aux composés protéiques. *C. R. Acad. Sc.*, 1849, **29**, 40-42.

45. Minot (Ad.) and Keller (M.). — *J. Lab. and Clin. Med.*, 1936, **21**, 743.

46. Morand (P.) et Dufau-Casanabe (J.). — Note sur le dosage opacimétrique des protéines en solution diluée. *Bull. Soc. Pharm. de Marseille*, 1955, **4**, 53.

47. Nasse (O.). — Ueber die verwandbarkeit des Millon'schen reagens. *Arch. f. d. ges. Physiol.*, 1901, **83**, 361-368.

48. Pauly (H.). — Zur kenntnis der diazoreaktion des eiweisses. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1915, **94**, 284-290.

49. Riegler (E.). — *Z. Anal. Chem.*, 1914, **53**, 242.

50. Rossi (A.) and Vescia (A.). — Microdeterminazione della terosina nelle proteine. *J. Biol. Chem.*, 1942, **143**, 685-693.

51. Sakaguchi (S.). — Uber die bindungsweise und quantitative bestimmung des arginins in protein molecule. *J. Biochem* (Japan), 1925, **5**, 25. — *Ibid.*, 1925, **5**, 133. — *Ibid.*, 1925, **5**, 143.

52. Shaffert ( ) and Somogyi. — Copper-iodometric reagents for sugar determination. *Journ. Biol. Chem.*, 1933, **100**, 695.

53. Shaw (J.L.D.) and Mac Farlane (W.D.). — The determination of tryptophan by a modified glyoxylic acid method employing photoelectric colorimetry. — *Canad. J. research*, 1938, **16 B**, 361-368.

54. Vincent (D.) et Brygoo (P.). — Sur le dosage de l'arginine par la réaction de Sakaguchi. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, **28**, 43.

55. Weber (C.J.). — A modification of Sakaguchi's reaction for the quantitative determination of arginine. *J. Biol. Chem.*, 1930, **86**, 217-222.

56. Weichselbaum (T.E.). — An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood sérum and plasma. *Ann. J. Clin. Path.*, 1946, **10**, 40.

57. Weiss (M.) et Ssobolew (N.). — Uber ein colorimetrisches verfahren zur quantitaven bestimmung des histidins. *Biochem. Ztschr.*, 1913-1914, **58**, 119-129.

58. Winkler (S.). — Uber die tryptophan reaktion von Adamkiewicz Hopkins. *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1934, **228**, 50-60.

59. Wu (H.). — A new colorimetric method for the determination of plasma proteins. *J. Biol. Chem.*, 1922, **51**, 33.

60. Wu (H.) and Ling (S.M.). — *Chinese J. Physiol.*, 1927, **1**, 161.

61. Zalta (J.P.) et Mme Khouvine (Y.). — Dosage de la lysine, de la tyrosine et de l'arginine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, **35**, 697.

62. Zuwerkalow (D.). — Zur frage der tyrosinbestimmung mit hilfe der Millon' schen reaktion. *Ztschr. f. Physiol. Chem.*, 1927, **163**, 185-192.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 13

I. — Colorimétrie 13

II. — Choix d'une méthode de référence pour le dosage de l'azote protéique 14

A) Méthode de Kjeldahl 14

1° Minéralisation sulfurique des corps organiques 14

2° Dosage de l'ammoniac 15

B) Gravimétrie 17

C) Spectrophotométrie en lumière U.V. 17

D) Néphélémétrie 18

III. — Microdosage colorimétrique des protéines 20

1. — Réaction de Millon 21

2. — Réaction à l'acide glyoxalique 22

3. — Réaction de Sakaguchi 23

4. — Réaction xanthoprotéique 25

5. — Réaction du biuret 27

6. — Réaction à l'acide phosphotungstomolybdique 29

7. — Réaction de Pauly 32

IV. — Objet du travail 35

⁂

RECHERCHES PERSONNELLES

Première partie : Sur le microdosage colorimétrique de la protéinorachie 37

A) Dosage colorimétrique 37

B) Etalonnage 39

C) Détermination de quelques protidorachies par la méthode colorimétrique étudiée 43
D) Justification de la méthode 45

⁂

Deuxième partie : Méthode colorimétrique de dosage de l'azote protéique basée sur la formation d'azoprotéines 47
— Préparation de la tribromo-aniline 48
— Préparation du réactif au diazotribromobenzène. 48
— Principe de la réaction 49
— Dosage de la tyrosine en solution pure..... 51
— Dosage colorimétrique de l'azote protéique du sérum sanguin 53

⁂

— Etude comparée des résultats obtenus lors de la détermination de l'azote protéique du sérum sanguin par le microkjeldahl et les méthodes colorimétriques utilisant l'acide phosphotungstomolybdique, le diazotribromobenzène et la réaction du biuret..... 57

CONCLUSIONS 61

BIBLIOGRAPHIE 67

IMP. RULLIÈRE - AVIGNON